

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Štěpán Chvojka

Molekulární mechanizmy aktivace a modulace TRPV3 receptoru
Molecular mechanisms of activation and modulation of TRPV3
receptor

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.4.2015

Štěpán Chvojka.....

Rád bych poděkoval zejména Ph.D. Štěpáně Boukalové a dr. Viktorii Vlachové. Štěpce za uvedení a seznámení s fungováním laboratoře, dále pak za její trpělivost a pomoc při mém zaučování v patch-clampových dovednostech. Stejně poděkování patří i školitelce dr. Viktorii Vlachové, která mi byla nápomocná při jakémkoliv problému a její rady a trpělivost mě vždy posunuly o kousek dál v mém bádání. Chtěl bych také poděkovat Magdě Kuntošové, která pečovala o buňky v mojí nepřítomnosti, a také přátelskému kolektivu z Oddělení buněčné neurofyzziologie, kde vládne skvělá atmosféra.

Abstrakt

TRPV3 receptor je teplotně citlivý iontový kanál patřící do rodiny TRP (transient receptor potential) vaniloidních receptorů. Tento kanál je exprimován v keratinocytech kůže, kde se společně s receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR) podílí na růstu a morfogenezi chlupů, tvorbě kožní bariéry, detekci teplotních změn, vzniku bolesti a pruritu. TRPV3 je aktivován řadou rostlinných produktů, jako je karvakrol z oregána, tymol z tymiánu nebo eugenol z hřebíčku. Jeho unikátní vlastností je senzitivace, postupné zvyšování proudové odpovědi při opakované aplikaci agonisty, molekulární podstata tohoto děje však není dosud objasněna. Jednou ze zvažovaných možností je přímá fosforylace TRPV3 proteinu prostřednictvím signální dráhy zahrnující EGFR a mitogenem aktivovanou protein kinázu MAPK1/MAPK3 (také zvanou ERK2/ERK1). V předložené diplomové práci jsme pomocí elektrofyziologické techniky *patch-clamp* zjišťovali, zda senzitivace TRPV3 receptoru exprimovaného v buněčné linii lidských imortalizovaných keratinocytů může být ovlivněna mutacemi na predikovaných konsenzuálních místech pro fosforylaci MAPK1/MAPK3. Z osmi testovaných mutantů, ve kterých byl zaměněn treonin nebo serin za kyselinu asparagovou mimikující fosforylaci, jsme určili 6 míst, jejichž mutace ovlivnila alespoň jeden z testovaných funkčních parametrů aktivace TRPV3. Jedna z těchto mutací, T264D, vedla ke zvýšení amplitudy membránových proudů při první aplikaci agonisty a receptor již dále nesenzitivoval. Naše výsledky tedy naznačují, že treonin na pozici T264 může představovat potenciální místo fosforylace související se signální drahou aktivovanou EGFR.

Abstract

Transient receptor potential vanilloid 3 receptor channel (TRPV3) is a thermosensitive ion channel expressed in skin keratinocytes. There, in a molecular complex with the epidermal growth factor receptor (EGFR) contributes to proliferation and terminal differentiation of keratinocytes, temperature detection, pain and pruritus. TRPV3 is activated by a number of exogenous compounds, such as carvacrol from oregano, thymol from thyme and eugenol from clove. Its unique feature is sensitization, TRPV3 channel activity successively increases upon repeated stimulation. The molecular basis of this process is not yet understood. One of the considered possibility is a direct phosphorylation of TRPV3 protein through signaling pathways involving EGFR and mitogen-activated protein kinase MAPK1 / MAPK3 (also called ERK2 / ERK1). In this thesis we investigated whether sensitization of TRPV3 which is expressed in a human cell line immortalized keratinocytes could be influenced by mutations on the predicted consensual phosphorylation sites for MAPK1 / MAPK3. We used electrophysiological patch-clamp technique and tested eight mutants, in which was threonine or serine replaced with aspartic acid mimicking phosphorylation. We identified six residues where the mutations influenced at least one of the functional parameters of TRPV3 activation. One of these mutations, T264D, led to an increase in the amplitude of membrane currents for the first application of agonist and receptor did not sensitize further. Our results indicate that the threonine at position T264 is a potential phosphorylation site related to the signaling pathway activated by EGFR.

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK.....	8
2	ÚVOD	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Rodina TRP receptorů.....	11
3.2	TRPV receptory	12
3.3	TRPV3 receptor	14
3.4	Struktura TRPV3	15
3.5	Teplotní aktivace TRPV3	17
3.6	Signální dráhy uplatňující se v regulaci a aktivaci TRPV3	18
4	CÍLE PRÁCE	22
5	POUŽITÉ METODY	23
5.1	Buněčné kultury a kultivace	23
5.2	Pasážování a transfekce	23
5.3	Mutageneze TRPV3 receptoru	23
5.4	Elektrofyzilogické snímání	24
5.5	Experimentální roztoky	25
5.6	Statistická analýza a hodnocení záznamů	26
6	VÝSLEDKY	27
6.1	Základní charakterizace proudových odpovědí zprostředkovaných TRPV3 receptorem	27
6.2	TRPV3 iontový kanál jako teplotní receptor	29
6.3	Potenciální místa pro fosforylaci TRPV3 receptoru ERK kinázou	31
6.4	Vytvoření bodových mutací a jejich funkční ověření metodou patch-clamp	33
6.5	T264	39
7	DISKUZE	44
7.1	Charakteristické vlastnosti TRPV3.....	44
7.2	Synergické působení chemického a tepelného podnětu.....	44
7.3	Určení potenciálních míst TRPV3 receptoru pro fosforylaci ERK kinázou a jejich funkční ověření technikou patch-clamp.....	45

7.4	Možné úlohy predikovaných reziduí v signalizační dráze TRPV3 iontového kanálu	45
8	ZÁVĚR.....	49
9	CITOVANÁ LITERATURA	50

1 Seznam zkratek

ARD	ankyrinová doména
2-APB	2-aminoetoxydifenylborát
ATP	adenosintrifosfát
C-konec	karboxylový konec proteinu
CaM	kalmodulin
cDNA	komplementární DNA syntetizovaná z templátu mRNA
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECS	extracelulární roztok
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EGTA	ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)tetraoctová kyselina
ERK	„extracellular-signal regulated kinase“
GFP	zelený fluorescenční protein
GTP	guanosintrifosfát
HaCaT	linie imortalizovaných lidských keratinocytů
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazin ethansulfonová kyselina
ICS	intracelulární roztok
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfát
KO	knockout
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
MEK	„mitogen-activated protein kinase kinase“
N-konec	aminový konec proteinu
P-loop	hydrofobní klička
PI-3	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kináza
PBS	fosfátový pufr; „phosphate buffered saline“
PCR	polymerázová řetězová reakce
PKC	protein kináza C
PLC γ	fosfolipáza C
Q_{10}	teplotní koeficient

Raf	protein kináza; „rapidly accelerated fibrosarcoma“
Ras	GTP fosfohydroláza; „rat sarcoma“
TGF- α	transformující růstový faktor- α
TM	transmembránový
TRP	„transient receptor potential“
WT	wild-type

2 Úvod

Některé iontové kanály a receptory, které jsou exprimovány na primárních aferentních senzorických neuronech a v kůži, umožňují živým organismům detekovat vnější podněty a převést je na elektrickou signalizaci oznamující bezprostřední ohrožení. Studium struktury těchto unikátních proteinů a určení jejich výlučné úlohy v transdukcii a přenosu senzorické informace bylo umožněno teprve v nedávné době, kdy byl technikami molekulární biologie a elektrofyzologie objeven první receptor vytvářející komplex iontového kanálu na periferních zakončeních primárních nociceptorů. Byl jím iontový kanál z později identifikované rozsáhlé skupiny tzv. "transient receptor potential" (TRP) receptorů, vaniloidní receptor podtypu 1, TRPV1. Pozdější studie prokázaly, že tento iontový kanál je zodpovědný za vnímání bolesti, která je vyvolaná zánětem, vysokými teplotami nebo poškozením tkáně. Přestože iontové kanály vaniloidní TRP podskupiny sdílí podobné základní strukturální charakteristiky a k jejich poznání napomáhá do značné míry analogie s TRPV1, existují výrazné rozdíly nejen v aktivačních a modulačních mechanismech, ale i v distribuci a s tím souvisejících fyziologických funkcích. TRPV3 je na rozdíl od TRPV1 hojně exprimován v kůži, kde se podílí na základních funkcích, jež udržují její homeostázu, tj. reguluje proliferaci, diferenciaci a apoptózu epidermálních keratinocytů. V komplexu s receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR) a pro transformující růstový faktor- α se TRPV3 podílí na tvorbě epidermální bariéry jako nejdůležitější složky základní funkce kůže, a to ochrany vnitřního prostředí před působením škodlivých vlivů zevního prostředí. Jakou úlohu v tomto signálním komplexu má TRPV3 a do jaké míry může být jeho aktivita ovlivňována působením těchto signálních drah? Tato otázka je předmětem předložené diplomové práce, ve které jsme se zaměřili na zjištění možné úlohy fosforylace TRPV3 serin/threonin kinázami, jež jsou součástí mitogenem aktivované protein kinázové signalizační dráhy (MAPK), kterou spouští EGFR.

3 Literární přehled

3.1 Rodina TRP receptorů

Rodina TRP receptorů je představována početnou skupinou iontových kanálů, které se účastní mnohých buněčných procesů a podílejí se na nejrozumnějších fyziologických funkcích všech živých organismů. Lze je lokalizovat na membránách buněk téměř ve všech typech tkání. První člen této skupiny byl objeven při elektrofyziologických pokusech na fotoreceptorech u octomilky. U mutantního kmenu octomilky byla pozorována poškozená transdukce světla zapříčiněná mutací v genu kódujícím iontový kanál zodpovědný za depolarizaci fotoreceptorů (Cosens and Manning, 1969, Montell et al., 1985, Montell and Rubin, 1989, Minke, 2010). Následně pak byla objevena celá řada receptorů, které byly kódovány podobnou sekvencí DNA jako TRP iontový kanál u octomilky. Doposud bylo identifikováno 28 členů savčí rodiny TRP receptorů, která se podle homologie dále dělí do 6 podskupin: TRP ankyrinová (TRPA), TRP kanonická (TRPC), TRP melastatinová (TRPM), TRP mukolipinová (TRPML), TRP polycystinová (TRPP) a TRP vaniloidní (TRPV). TRP receptory jsou tetrametry, přičemž každá podjednotka se skládá z šesti transmembránových domén (TM1-6), kratší hydrofobní kličky (tzv. P-loop) mezi TM5 a TM6 a intracelulárně uloženého C- a N-konce. Pór pro průchod iontů je vytvořen centrálně orientovanými doménami TM5-P-TM6.

TRP receptory jsou důležitými zprostředkovateli senzorických signálů. Některé z těchto receptorů jsou schopné detekovat potenciálně škodlivé podněty a převést je na elektrický signál, který je pomocí senzorických neuronů veden do vyšších mozkových center. Tyto neurony, které obsahují receptory detekující potenciálně škodlivé podněty, ať už v podobě tepelné, chemické nebo mechanické, se nazývají nociceptory. Vlastnosti této specifické skupiny neuronů jsou intenzivně studovány v souvislosti s mechanismy bolesti. Řada současných farmakologických studií je zaměřena na výzkum funkčních vlastností TRP iontových kanálů, které jsou exprimované v nociceptivních neuronech a na vyhledávání účinných inhibitorů, jež by mohly mít potenciálně analgetické účinky (Kaneko and Szallasi, 2014).

3.2 TRPV receptory

Vaniloidní skupina TRPV zahrnuje šest receptorů pojmenovaných po prvním objeveném savčím členovi, a to sice po TRPV1 receptoru, který je aktivovaný látkami obsahujícími vaniloidní skupinu (Caterina et al., 1997). Mezi vaniloidní členy se řadí čtyři teplotně aktivované iontové kanály: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, které jsou neselektivně propustné pro monovalentní i dvojmocné kationty. Tyto kanály propouštějí vápenaté ionty s relativní propustností $P_{Ca}/P_{Na} \sim 2-13$. Naproti tomu TRPV5 a TRPV6 kanály jsou vysoce selektivní pro Ca^{2+} ($P_{Ca}/P_{Na} > 100$). Funkce všech šesti TRPV receptorů je významně regulována intracelulární koncentrací Ca^{2+} .

TRPV1: Specifickými agonisty vaniloidního receptoru podtypu 1, TRPV1, je kapsaicin, jenž je zodpovědný za pálivou chuť chilli papriček, a reziniferatoxin, ultrapotentní analog kapsaicinu produkovaný pryšci (Caterina et al., 1997). Další látkou, která vyvolává palčivý vjem u člověka, je alicin, derivát česneku, který aktivuje nejen TRPV1, ale také TRPA1 (Macpherson et al., 2005). Do rozsáhlého souboru agonistů TRPV1 receptoru se dále řadí nízké extracelulární pH, nefyziologické teploty vyšší než 43 °C, membránová depolarizace a řada endogenních látek (anandamid, N-arachidonoyl-dopamin) (Caterina et al., 1997, Tominaga et al., 1998, Zygmunt et al., 1999, Huang et al., 2002). TRPV1 iontový kanál je exprimován v slabě myelinizovaných (A δ) a nemyelinizovaných (C) nociceptivních vláknech neuronů, které jsou zodpovědné za přenos bolestivých signálů (Caterina et al., 2000). Funkce TRPV1 receptoru může být regulována různými intracelulárními molekulami, mezi které patří například ATP a kalmmodulin, jež kompetují o stejné interakční místo na aminovém konci a působí navzájem protichůdně v senzitivaci a desenzitivaci TRPV1 iontového kanálu (Lishko et al., 2007). Na senzitivaci TRPV1 se podílí i některé zánětlivé mediátory jako bradykinin nebo prostaglandiny, které prostřednictvím dalších signálních molekul snižují aktivační práh TRPV1 iontového kanálu. Tento jev úzce souvisí s tepelnou hyperalgezií, na které se tento receptor významně podílí. Bylo dokázáno, že při aplikaci zánětlivých mediátorů dochází ke snížení aktivačního prahu a TRPV1 může být aktivován již při nižších okolních (fyziologických) teplotách (Sugiura et al., 2002, Moriyama et al., 2005, Touska et al., 2011). Prokazatelná účast TRPV1 kanálu v mechanismech vzniku bolestivých a zánětlivých stavů vyvolala zájem o studium TRP receptorů u mnoha farmaceutických firem, které cíleně vyhledávají a testují různé látky, jež by mohly působit jako analgetika (Kort and Kym, 2012).

TRPV2: Dalším teplotně aktivovaným iontovým kanálem patřícím k vaniloidní skupině, jenž je exprimován na středně velkých sensorických neuronech, je TRPV2 receptor. Mezi takzvanými thermo-TRP receptory drží prvenství v hodnotě prahové teploty, při které je aktivován (~52 °C) (Caterina et al., 1999). Ukázalo se však, že na rozdíl od příbuzného TRPV1 receptoru se TRPV2 nepodílí na vnímání bolestivé teploty a zánětlivé hyperalgezie. Tato skutečnost byla prokázána při pokusech s TRPV2 KO experimentálními myši, které se nijak nelišily od kontrolních myší v teplotní citlivosti ani v případě uměle navozeného zánětu (Park et al., 2011). Kromě teploty je TRPV2 receptor aktivován některými chemickými látkami, jen málo z nich lze však považovat za specifického agonistu. Příkladem takové látky je probenicid, který má mimo jiné urikosurický účinek a používá se při léčbě dny (Hediger et al., 2005, Bang et al., 2007). Další látkou, jež je společným agonistou tří vaniloidních receptorů TRPV1-TRPV3, je 2-aminoetoxydifenylborát (2-APB) (Hu et al., 2004). Zajímavostí však je, že exprimovaný lidský, myší a potkaní TRPV2 receptor v HEK293 buňkách vykazuje rozdílné vlastnosti při aktivaci 2-APB a zvýšenou teplotou. U myšího a potkaního podtypu TRPV2 receptoru byla zaznamenána vysoká aktivita při aplikaci 2-APB nebo teploty přesahující 53 °C, naproti tomu lidský typ TRPV2 receptoru se těmito dvěma podněty nepodařilo aktivovat (Neeper et al., 2007).

TRPV3: Tento iontový kanál patří k zatím nejméně prozkoumaným členům vaniloidní podskupiny TRP receptorů. Přestože sdílí značnou homologii v primární sekvenci a podobné strukturní charakteristiky s ostatními TRPV receptory, expresí i řadou funkcí se od nich odlišuje. Předložená diplomová práce se zabývá studiem vlastností tohoto iontového kanálu, a proto je popisu TRPV3 věnována zvláštní kapitola (viz níže).

TRPV4: Čtvrtý zástupce vaniloidních receptorů je TRPV4. Tento neselektivní kationtový kanál je dalším důležitým detektorem fyzikálních i chemických stimulů a je podstatný pro mnoho fyziologických funkcí. Jeho aktivitu lze zaznamenat již při fyziologických teplotách (27-34 °C) (Guler et al., 2002, Watanabe et al., 2002). Výzkum na myších s vyřazeným genem pro TRPV4 receptor, které byly vystaveny bolestivým i nebolestivým teplotám, prokázal, že TRPV4 je důležitý pro citlivost k tepelným podnětům (Todaka et al., 2004, Lee et al., 2005). Jiná studie s TRPV4 KO zvířaty ukázala, že se tento receptor podílí na transdukcii osmotického tlaku a přispívá v rozvoji osmotické hyperalgezie. Významné rozdíly mezi KO a wild-type zvířaty byly pozorovány při aplikaci slabého hypertonického roztoku chloridu sodného (Alessandri-Haber et al., 2005). Další úloha tohoto receptoru se zřejmě uplatňuje při vzniku mechanické hyperalgezie. U zvířat s vyřazeným

funkčním genem pro TRPV4 receptor, kterým byl uměle vyvolán zánět, byl zaznamenán snížený počet odtáhnutí tlapky při mechanické stimulaci ve srovnání s kontrolními zvířaty (Alessandri-Haber et al., 2006). O fyziologickém významu TRPV4 receptoru nasvědčuje i jeho široká distribuce: v hmatových těliscích kůže, keratinocytech, v placentě, slezině, ledvinách, endotelu, plicích, urotelu, varlatech, v tukové tkáni, ale také v mozku, neuronech ganglií zadních míšních kořenů, ve vnitřních i vnějších vláskových buňkách Cortiho orgánu (Liedtke et al., 2000, Strotmann et al., 2000, Wissenbach et al., 2000, Delany et al., 2001, Peier et al., 2002, Chung et al., 2003).

TRPV5 a TRPV6: Receptory TRPV5 a TRPV6 jsou unikátními členy celé TRP rodiny receptorů. Jsou totiž jako jediní z této velké rodiny iontových kanálů vysoce selektivní pro Ca^{2+} (Vennekens et al., 2000). Tato vlastnost je velice důležitá, protože mnoho fyziologických funkcí je podřízeno vápenatým iontům, které musí být udržovány v rovnováze, což je velmi přísně regulováno. TRPV5 a TRPV6 jsou specializované epiteliální iontové kanály, jež zprostředkovávají (re)absorpci Ca^{2+} ve střevě a ledvinách (Hoenderop et al., 2003, Nijenhuis et al., 2005).

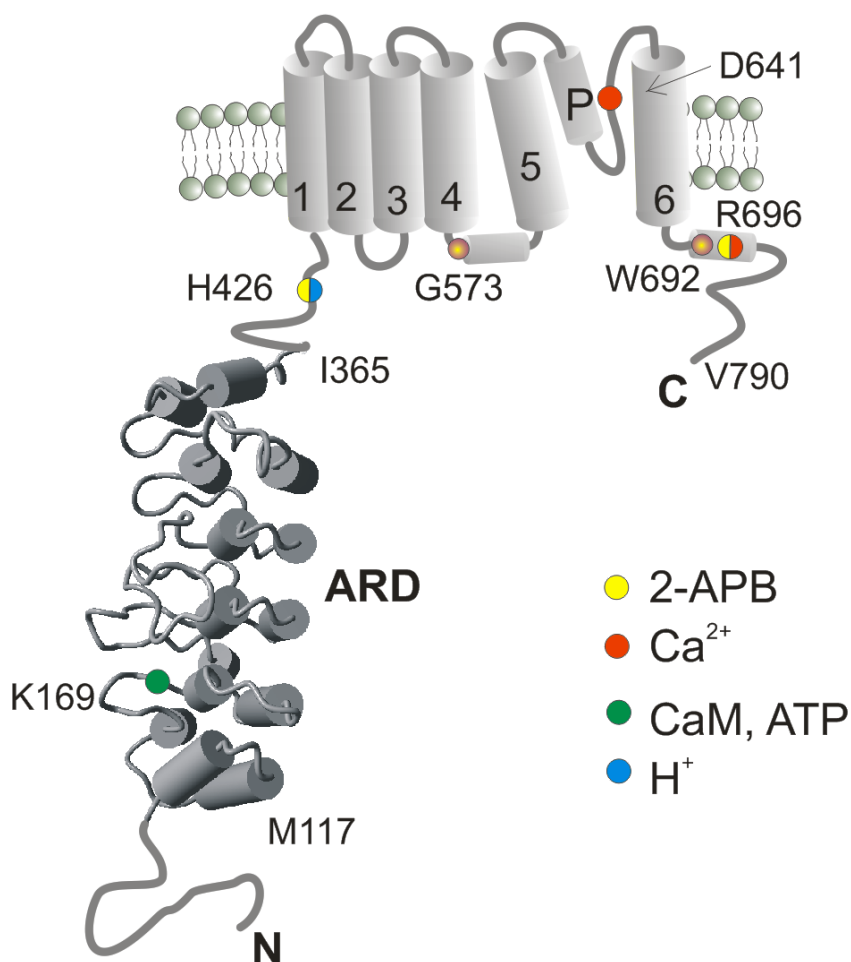
3.3 TRPV3 receptor

TRPV3 je neselektivní kationtový kanál ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 13$), aktivovaný teplem již při fyziologických hodnotách ($> 33\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Peier et al., 2002, Smith et al., 2002). Pokusy na myších s vyřazeným TRPV3 genem prokázaly význam tohoto receptoru při vnímání bolestivých i nebolestivých teplot, což naznačuje, že se TRPV3 účastní tepelné citlivosti a nocicepce (Moqrich et al., 2005). Kromě teploty je TRPV3 receptor aktivován přírodními látkami, jako jsou karvakrol, eugenol nebo tymol, které společně patří do skupiny monoterpenů (Moqrich et al., 2005, Xu et al., 2006). Z endogenních látek byl doposud identifikován zatím jediný a zřejmě specifický aktivátor farnesyl pyrofosfát (Bang et al., 2010). TRPV3 receptor má dvě pozoruhodné vlastnosti, kterými se odlišuje od ostatních TRPV receptorů: (1) Při opakované stimulaci je TRPV3 postupně senzitivizován, a to závisle na vlastní aktivitě (Peier et al., 2002, Xu et al., 2002, Chung et al., 2004). (2) TRPV3 receptor je hojně exprimován v keratinocytech kůže v blízkosti nervových zakončení, které jsou nezbytné pro odpověď na fyzické a chemické podněty (Peier et al., 2002, Smith et al., 2002, Xu et al., 2002). Aktivací takto umístěných TRPV3 receptorů dochází k uvolnění množství substancí, jež spouští další dráhy ovlivňující nejen nervová zakončení, ale i tvorbu kožní bariéry nebo růst vlasů (Cheng et al., 2010). Vzhledem ke specifické lokalizaci (epidermis) zajišťuje TRPV3 důležitou úlohu

v různých fyziologických i patofyziologických funkcích kůže, jako jsou růst a morfogeneze chlupů, kožní zánět, bolest a pruritus.

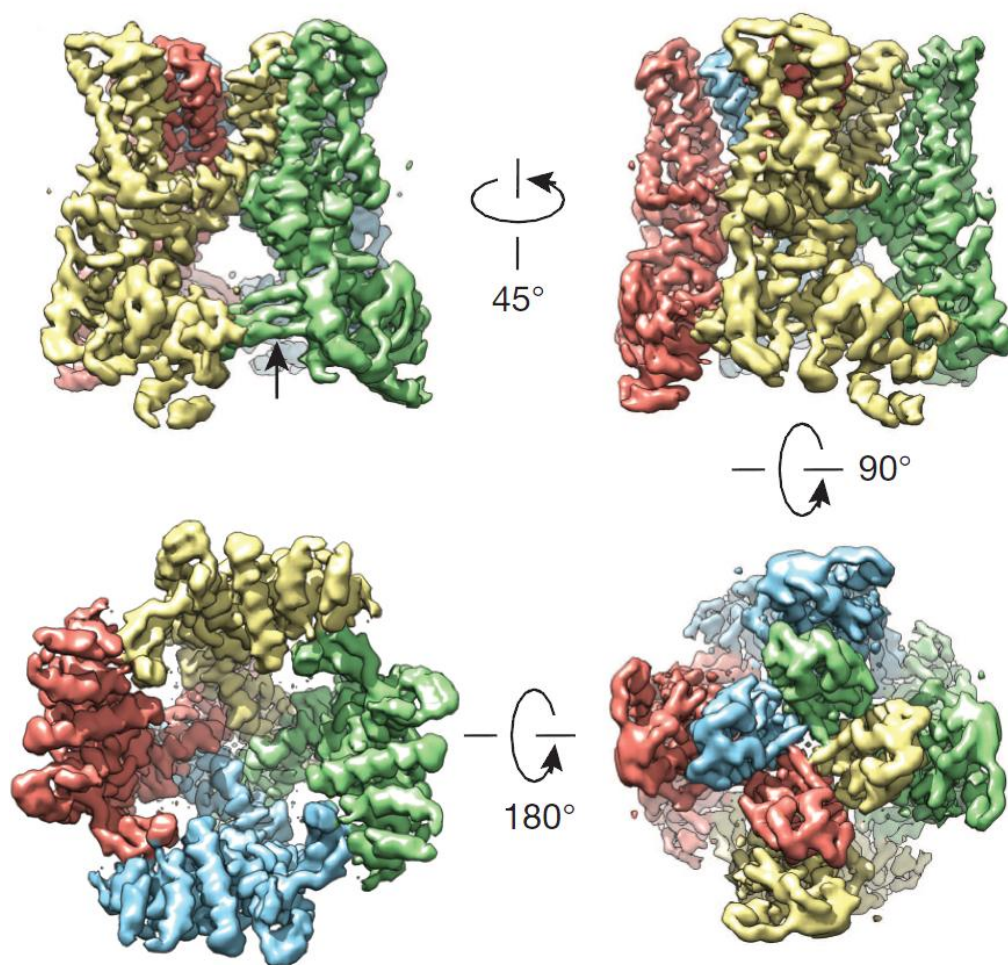
3.4 Struktura TRPV3

Výsledkem kompletního čtecího rámce lidského a myšního TRPV3 receptoru je 2373 párů bází, které jsou přepsány na polypeptid se 791 aminokyselinami (Peier et al., 2002). Primární sekvence tohoto lidského proteinu je z 38% totožná s TRPV1 a TRPV4 receptorem (Xu et al., 2002). Myší TRPV3 protein sdílí s TRPV1 a TRPV4 dokonce 43% svých aminokyselin (Peier et al., 2002). Stejně jako ostatní TRP kanály i TRPV3 kanál funguje jako homotetramerní komplex. Funkční iontové kanály může vytvářet TRPV3 i heteromerizací s TRPV1. Každá podjednotka TRPV3 zahrnuje šest transmembránových domén, přičemž pátá a šestá transmembránová doména spolu s hydrofobní kličkou vytvářejí pór iontového kanálu. Velká část receptoru je uložena mimo membránu na cytoplazmatické straně v podobě aminového a karboxylového konce (obrázek 3.1).



Obrázek 3.1 Topologické uspořádání podjednotky lidského TRPV3 receptoru. ARD, ankyrinová doména obsahující 6 ankyrinových repetit, P, pórový helix, vyznačena jsou rezidua, která jsou klíčová pro aktivaci nebo modulaci TRPV3 vápenatými ionty, 2-APB, kalmodulinem a ATP. "Zesilující" (tzv. gain-of-function) mutace G573S, G573C a W692G byly popsány jako příčina vrozené poruchy vývoje ektodermálních a mezodermálních struktur u člověka (Olmstedův syndrom).

Vzhledem k významné homologii primární aminokyselinové sekvence je podjednotkové uspořádání TRPV3 s největší pravděpodobností velmi podobné terciární struktuře TRPV1 (Cao et al., 2013, Liao et al., 2013). Představu o konformačních změnách během aktivace TRPV3 lze získat na základě tří struktur TRPV1 kanálu získaných kryoelektronovou mikroskopií, z nichž jedna je v uzavřeném stavu a dvě v otevřené konformaci s navázaným agonistou (kapsaicinem a reziniferatoxinem) a toxinem, který stabilizuje pór kanálu (obrázek 3.2). Nejlépe strukturálně popsanou částí TRPV3 je ankyrinová doména na aminovém konci receptoru, jejíž krystalová struktura byla publikována nedávno v rozlišení 1.95 Å (Shi et al., 2013).



Obrázek 3.2 Trojrozměrná rekonstrukce struktury TRPV1 iontového kanálu získaná jednočásticovou kryoelektronovou mikroskopií. Hustotní mapa je filtrovaná na rozlišení 3.4 Å. Podjednotky jsou vyznačeny odlišnými barvami. Čtyři různé pohledy na strukturu: nahoře, boční pohled, dole vlevo, pohled shora, dole vpravo, pohled zdola. Šipka označuje cytoplazmatickou část (Cao et al., 2013, Liao et al., 2013).

3.5 Teplotní aktivace TRPV3

Detekce teploty je důležitým senzoričným mechanismem, který je nezbytný pro přežití živých organismů, ať už se jedná o udržování vnitřní teploty těla, nebo o ochranu před potenciálním poškozením tkáně nefyziologickou teplotou. Identifikace teplocitlivých TRP iontových kanálů napomohla porozumět některým molekulárním a buněčným mechanismům, pomocí kterých jsme schopni okolní teplotu vnímat (Dhaka et al., 2006). K členům této TRP rodiny receptorů patří iontové kanály TRPV1 a TRPV2, které jsou aktivované vysokými, nefyziologickými teplotami ($>43^{\circ}\text{C}$ a 55°C), TRPM8 a TRPA1, které naopak detekují nízké teploty blízké se prahu pro vznik bolesti u člověka ($\sim 15^{\circ}\text{C}$) a TRPV3 a TRPV4, jež jsou

aktivované při fyziologických teplotách (Caterina et al., 1997, Caterina et al., 1999, Davis and Pope, 2002, McKemy et al., 2002, Peier et al., 2002, Smith et al., 2002, Watanabe et al., 2002, Story et al., 2003, Dhaka et al., 2006).

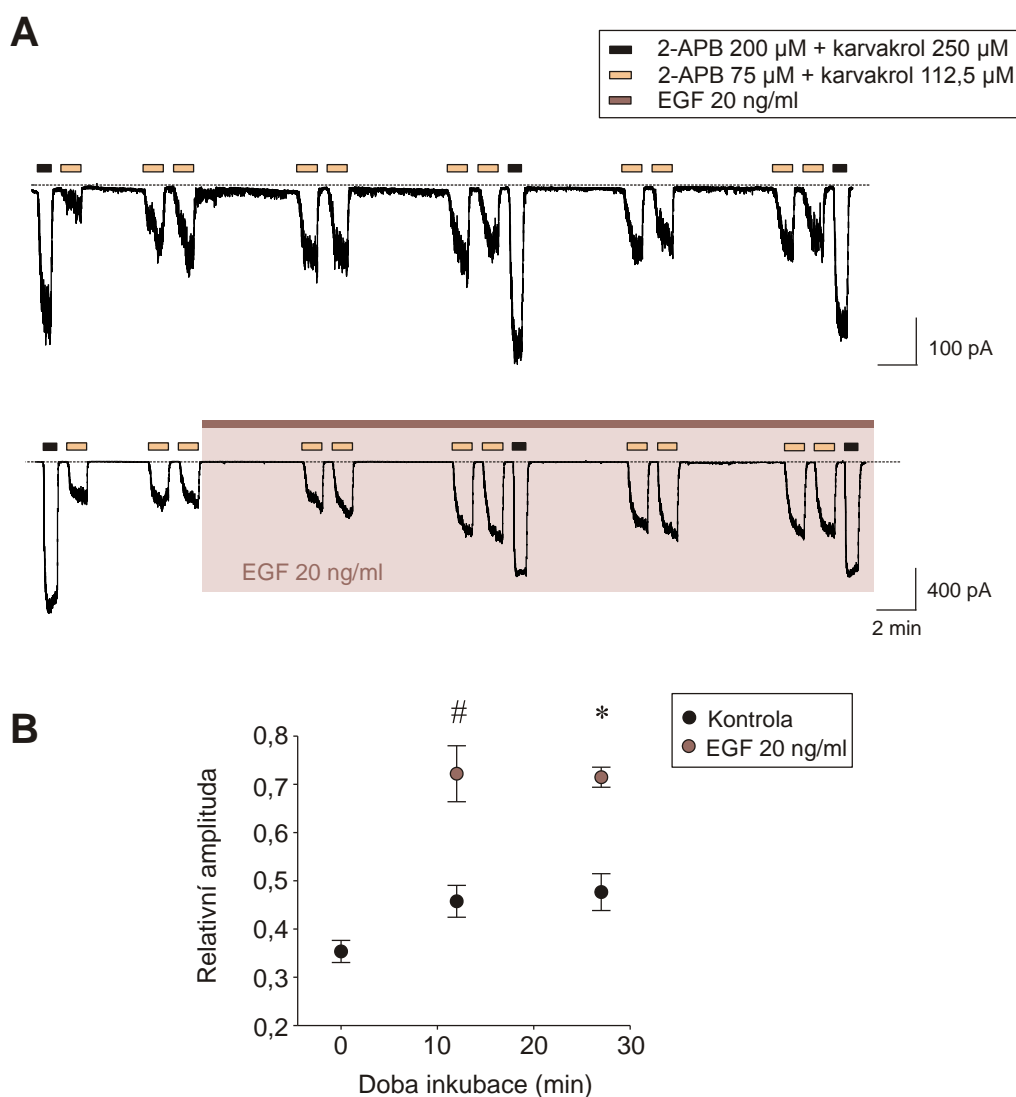
Aktivační práh TRPV3 receptoru se pohybuje v rozmezí 33-39°C, jeho zařazení mezi teplotní senzory je však stále nejisté. Dvě publikované studie, ve kterých byla testována teplotní citlivost myši, kterým byl vyřazen funkční gen pro TRPV3, předkládají protichůdné výsledky. Výzkum v roce 2005 prokázal účast TRPV3 receptoru ve vnímání bolestivých i nebolestivých tepelných podnětů. Při behaviorálních testech se ukázalo, že TRPV3 KO myši, ve srovnání s divokým typem, strávily většinu času na místě mimo fyziologické teploty. Porucha vnímání bolestivého tepla pak byla zaznamenána u KO zvířat při pokusech s teplotou poškozující organismus (Moqrich et al., 2005). Naproti tomu studie z roku 2011 neprokázala významnou úlohu TRPV3 receptoru jako teplotního čidla u myši (Huang et al., 2011). Dokonce ani při současném vyřazení genů pro dva receptory, TRPV3 a TRPV4, nebyla zaznamenána odchylka v teplotní citlivosti při porovnání s WT. Defekt ve vnímání teploty mohl být způsoben rozdílným genetickým pozadím myši obou studií.

3.6 Signální dráhy uplatňující se v regulaci a aktivaci TRPV3

Genetické studie potvrdily, že mutace G573S a G573C ve spojovací oblasti mezi 4. a 5. transmembránovou doménou TRPV3 receptoru jsou příčinou alopecie a spontánní dermatitidy u myši. Vyřazení genu pro TRPV3 u experimentálních zvířat vede k poruchám morfogeneze chlupů a vousů (Xiao et al., 2008). Pozdější studie potvrdily, že TRPV3 v epidermálních keratinocytech vytváří signální komplex s receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR), který je nezbytný pro regulaci buněčného cyklu, proliferace, diferenciaci a obnovu kožní bariéry. EGFR je transmembránovým receptorem, jenž je v keratinocytech aktivován růstovými faktory EGF a mitogenním polypeptidem TGF- α (transforming growth factor- α). Defekt v TGF- α /EGFR signalizaci vede k abnormální vlasové morfogenezi, jenž se ve fenotypu projeví abnormálně vlnitými vlasy a kudrnatými vousy, podobně jako je tomu při vyřazení funkčního genu pro TRPV3 (Schneider et al., 2008). Naproti tomu výsledkem nadměrné aktivity TGF- α /EGFR je alopecie a rakovina kůže (Ferby et al., 2006, Schneider et al., 2008).

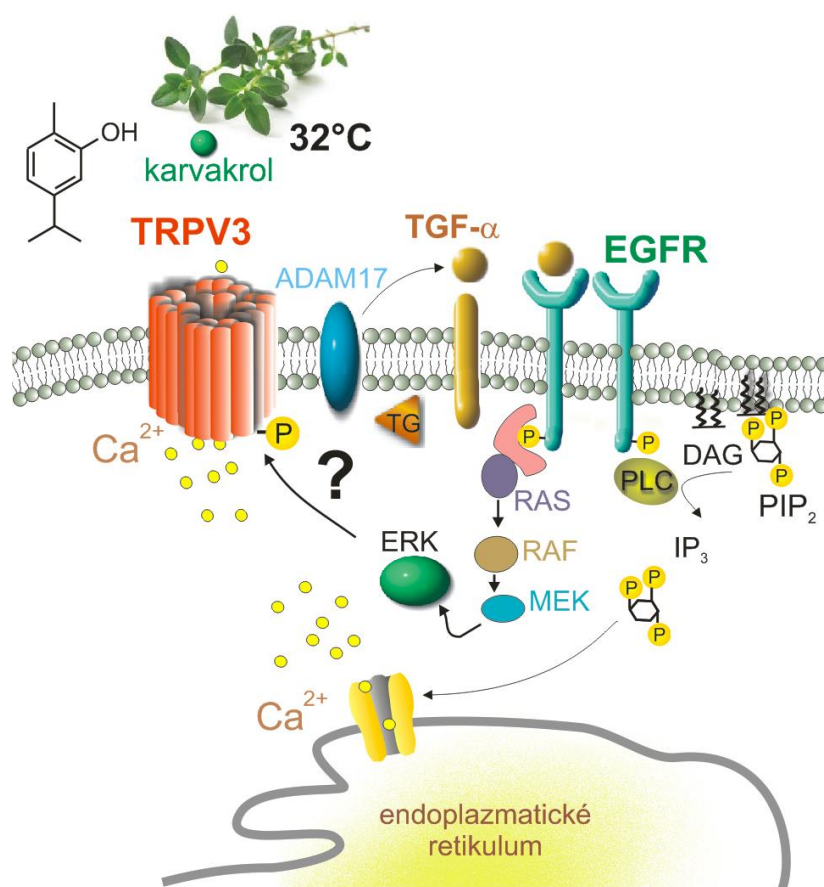
EGFR je spřažen s intracelulárními drahami a efektory, zahrnujícími fosfolipázu C γ (PLC γ), PI-3 kinázu, protein kinázu C a MAP kinázovou signalizační kaskádu (obrázek 3.4).

Buněčné mechanismy regulace aktivity TRPV3 receptoru v této souvislosti nejsou doposud příliš prozkoumány. Bylo zjištěno, že kultivace primárních keratinocytů v médiu s přidanými růstovými faktory TGF- α a EGF po dobu několika hodin zvýší aktivitu TRPV3 receptoru při stimulaci chemickými podněty (Cheng et al., 2010). V nedávné době byly v naší laboratoři studovány účinky růstového faktoru EGF na aktivitu endogenních TRPV3 receptorů exprimovaných v HaCaT buňkách a bylo zjištěno, že EGF (20 ng/ml) senzitivizuje TRPV3 receptor již při krátkodobé (cca 10 min) stimulaci (obrázek 3.3).



Obrázek 3.3 EGF působí senzitivizačně na aktivitu TRPV3 receptorů. (A) Reprezentativní záznamy proudových odpovědí HaCaT buněk vyvolané chemickou stimulací. (B) Amplituda odpovědí vyvolaná aplikací 75 μ M 2-APB v kombinaci s 112,5 μ M karvakrolem normalizovaná vůči maximální odpovědi vyvolané saturační koncentrací agonistů (200 μ M 2-APB s 250 μ M karvakrolu) (převzato Boukalová, 2013)

Naproti tomu přítomnost inhibitorů MAP kinázové dráhy vedla k odstranění stimulačního účinku EGF a nedošlo k významnému nárůstu odpovědi ve srovnání s kontrolními podmínkami (Boukalová, 2013). Na základě těchto pokusů jsme vyslovili hypotézu, že **modulační působení EGF je závislé na aktivitě MAPK dráhy, která může zprostředkovat přímou fosforylaci TRPV3 receptoru ERK kinázou**, mezi jejíž substráty se řadí i některé iontové kanály (Schrader et al., 2006, Shen et al., 2011). **Předložená diplomová práce bezprostředně navazuje na tato zjištění a zabývá se otázkou, zda funkce TRPV3 iontového kanálu může být regulována přímou fosforylací ERK kinázou** (Cheng et al., 2010).



Obrázek 3.4 Regulační dráhy zahrnující TRPV3 a TGF-α/EGFR. Vápenaté ionty zprostředkovávají zpětnou vazbu, kterou regulují aktivitu EGFR. Aktivovaný TRPV3 kanál způsobí vzestup koncentrace intracelulárních vápenatých iontů, které aktivují proteázu (ADAM17) a ta uvolní TGF-α. Růstové faktory navázané na EGF receptor zvyšují aktivitu a signální dráhou přes PLC a IP₃ dochází k dalšímu nárůstu Ca²⁺ otevřením intracelulárních zásob endoplazmatického retikula. Takto uvolněné vápenaté ionty pozitivní zpětnou vazbou potencují TRPV3 receptor a zvyšují jeho aktivitu. Kromě toho dochází k aktivaci signální dráhy EGFR/MAPK, na jejímž konci je ERK kináza, jež může přímo fosforylovat TRPV3 receptor. Identifikace potenciálních fosforylačních míst je předmětem této diplomové práce.

Signalizační dráha EGFR/ERK. Signalizační kaskáda, na jejímž začátku je aktivace receptoru pro epidermální růstový faktor EGFR, který prostřednictvím Ras (GTP fosforyláz, z angl. *rat sarcoma*) → Raf (protoonkogenní serin/treonin protein kináza, z angl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*) → MEK (MAPK/ERK kinase) stimuluje ERK kinázu, která může fosforylovat další proteiny a mimo jiné zřejmě i TRPV3 receptor na zatím neodhalených pozicích.

4 CÍLE PRÁCE

- Pomocí specifických agonistů charakterizovat aktivační a senzitivační vlastnosti lidského TRPV3 receptoru
- Určit teplotní citlivost lidského TRPV3 receptoru v heterologním expresním systému a prokázat synergické působení tepelného a chemického podnětu
- Pomocí predikčních serverů a programů určit potenciální místa pro fosforylaci TRPV3 receptoru ERK kinázou
- Vytvořit bodové mutace TRPV3 na predikovaných konsenzuálních fosforylačních místech a funkčně je ověřit elektrofyzilogickou technikou patch-clamp
- Určit možné úlohy predikovaných reziduí v signalizační dráze TRPV3 iontového kanálu.

5 POUŽITÉ METODY

5.1 Buněčné kultury a kultivace

Pro pokusy jsme používali buněčné linie lidských imortalizovaných keratinocytů HaCaT, které přirozeně exprimují TRPV3 receptor. Buňky byly pěstovány v 10% roztoku fetálního telecího séra v médiu DMEM. Výměnu média jsme prováděli 2-3krát za týden. Mističky s buňkami jsme kultivovali v termostatu při teplotě 37 °C v 5% CO₂ atmosféře, která udržuje neutrální pH.

5.2 Pasážování a transfekce

Pasážování jsme prováděli v případě, kdy buňky plně pokryly dno misky. Nejprve jsme odsáli médium a buňky dvakrát opláchli pomocí PBS bez Ca²⁺ a Mg²⁺. Posléze jsme přidali 0,25% trypsin s 0,02% EGTA, tak aby buňky byly plně ponořeny v roztoku. Následovala inkubace deset minut při 37 °C, při kterých trypsin štěpí adhezivní proteiny a EDTA vychytává vápenaté ionty, čímž dochází k uvolnění buněk od podložky. Po deseti minutách jsme buňky ještě mechanicky rozdisociovali a nasadili je na nové kultivační misky s čerstvým médiem.

Přenos DNA do buněk jsme prováděli pomocí transfekčního činidla Lipofectamine 2000. HaCaT buňky jsme transfekovali vektorem pcDNA5/FRT, který nesl cDNA kódující lidský TRPV3 receptor o koncentraci cDNA 150 ng na misku. Kromě toho jsme buňky transfekovali fluorescenčním proteinem (GFP), který nám označil buňky, u kterých proběhla úspěšná transfekce. Koncentrace cDNA GFP byla 300 ng na misku. Následný pokus proběhl 24-48 hodin po transfekci.

5.3 Mutageneze TRPV3 receptoru

Pro jednotlivé mutace jsme nejprve navrhli primery podle templátové DNA TRPV3 receptoru, které měly délku minimálně 30 nukleotidů a obsahovaly maximální množství C-G párů. Jejich výrobu zajistila firma Sigma-Aldrich. Mutační primery jsme vnášeli do přirozené sekvence aminokyselin TRPV3 iontového kanálu polymerázovou řetězovou reakcí PCR za použití chemické soupravy QuikChange XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Po proběhnutí této reakce jsme k produktu přidali restriční enzym DpnI a nechali inkubovat 1

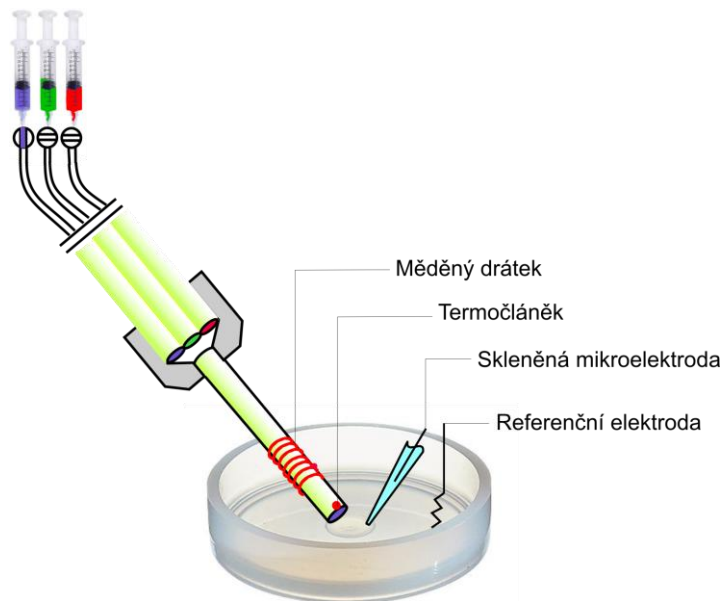
hod při 37 °C. Úkolem tohoto enzymu je rozštěpit původní DNA bez mutací. Poté jsme provedli transformaci (heat shock) produktu z PCR do komplementárních buněk, které jsme následně nasadili na agarové plotny a přes noc nechali narůst kolonie. Druhý den jsme zvolili vhodné samostatné kolonie a ty přeočkovali do připravených falkonek s LB médiem a antibiotikem (ampicilinem). Falkonky jsme nechali přes noc inkubovat na třepačce při 37 °C pro namnožení bakterií s potřebnou DNA. Další den jsme DNA izolovali pomocí chemické soupravy Plasmid DNA Miniprep Kit (Life Technologies). Pro kontrolu vnesených mutací jsme DNA nechali ověřit sekvencí (GATC, Německo).

5.4 Elektrofyzilogické snímání

Pro získání dat jsme zvolili elektrofyzilogickou metodu patch-clamp u nás známou jako terčíkový zámek. Technická výbava pro toto snímání zahrnovala invertovaný mikroskop Axiovert 135 (Zeiss), který byl umístěn na antivibračním stole TMC (Technical Manufacturing Co.), AD/DA převodník Digidata 1440A (Molecular Devices), zesilovač Axopatch 200B (Molecular Devices), mikromanipulátor (MP-225; Sutter Instrument Company) a počítače. K propojení mezi buňkou a potřebnou technikou jsme využili skleněné mikroelektrody naplněné intracelulárním roztokem (ICS). Skleněné mikroelektrody byly zhotoveny na horizontálním tahači P-1000 (Sutter Instrument Company) z borosilikátového skla, které má nízkou teplotu tavení, což usnadňuje modulaci hrotu mikroelektrody. K výrobě mikroelektrod jsme použili tlustostěnné skleněné trubičky, které lépe drží gigaseal (odpor v gigaohmových hodnotách). Optimální odpor elektrody pro snímání z celé buňky (whole-cell patch-clamp) po ponoření do extracelulárního roztoku (ECS) je 3-5 MΩ. Naplněné skleněné mikroelektrody se nasazují na stříbrný drátek, který je pokryt chloridem stříbrným. Elektrická informace je předávána z intracelulárního roztoku v mikroelektrodě na pochloridovaný drátek, který je napojen na zesilovač.

Pro samotné měření jsme vybrali zeleně svítící buňky označené fluorescenčním proteinem a buňky, které se vyskytovaly samostatně bez dotyku s ostatními. Všechna naše snímání byla prováděna v konfiguraci měření z celé buňky, konkrétně při napět'ovém zámku, kdy jsme udržovali membránový potenciál buněk na -70 mV. Pro aplikaci roztoků, které modulovaly aktivitu TRPV3 receptoru jsme využívali aplikační systém, který byl sestaven v naší laboratoři (Dittert et al., 1998, Dittert et al., 2006) (obrázek 5.1). Aplikované roztoky se nacházely v nádobkách, které jsou přes ventilký, které regulují tok roztoků, napojené na teflonové trubičky ústící do jedné skleněné kapiláry. Ta byla umístěna do blízké vzdálenosti

snímané buňky tak, aby se aplikované roztoky dostaly co nejdříve do kontaktu s buňkou. Do ústí skleněné kapiláry byl připevněn měděný drátek pro ohřev protékajícího roztoku na požadovanou teplotu, jejíž hodnota byla snímána termočlánkem.



Obrázek 5.1 Aplikační systém. Schématické zobrazení aplikačního systému, který je složen z nádobek, jenž obsahují experimentální roztok; z teflonových kapilár, které společně ústí do jedné skleněné, jejíž hrot je v těsné blízkosti buňky; z měděného drátku omotaného kolem skleněné kapiláry sloužícího k ohřevu protékajících roztoků a z termočlánku měřícího teplotu protékajícího roztoku. Kromě toho je na obrázku skleněná mikroelektroda s pochloridovaným drátkem a referenční elektroda, které jsou součástí zesilovače a umožňují záznam elektrické aktivity buňky.

5.5 Experimentální roztoky

Extracelulární roztok

Složení extracelulárního roztoku: 10 mM HEPES; 160 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM Glukosa; 1 mM CaCl_2 ; 2 mM MgCl_2 ; pH jsme upravovali na 7,34 pomocí NaOH. Osmolarita extracelulárního roztoku byla 320 mOsm.

Intracelulární roztok

Složení intracelulárního roztoku: 14 mM CsCl; 125 mM Cs-glukono- δ -laktón; 10 mM HEPES; 5 mM EGTA; 0,5 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; 2 mM Mg-ATP; 0,3 mM Na-GTP; pH jsme upravovali na 7,3 pomocí CsOH. Osmolarita intracelulárního roztoku byla 291 mOsm.

Aplikované látky

Látky, které jsme aplikovali, byly agonisté TRPV3 receptoru. Jejich zásobní roztoky jsme uchovávali v lednici nebo mrazáku, přičemž roztoky použité při pokusu byly připraveny v den experimentu smícháním extracelulárního roztoku s potřebným množstvím zásobního roztoku. Pro naše účely jsme uchovávali 1M roztok 2-APB v DMSO a 2M roztok karvakrolu v DMSO.

5.6 Statistická analýza a hodnocení záznamů

Pro záznam elektrofyziologických dat a jejich vyhodnocení jsme používali program pCLAMP 10. Pro následnou statistickou analýzu těchto dat jsme využili program SigmaPlot 10.0. V tomto programu jsme porovnávali hodnoty naměřené u jednotlivých mutací vůči sobě a ve srovnání s WT pomocí t-testu nebo Mann-Whitney testu. Data obsažená v této diplomové práci jsou vyjádřena ve formě průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka průměru. Statisticky signifikantní hodnoty jsou v grafech označeny hvězdičkou ($P < 0,05$).

Hodnocení záznamů:

Chemická aktivace: U tohoto typu aktivace jsme se soustředili na proudové amplitudy po jednotlivých aplikacích 2-APB, kdy jsme po každé aplikaci zaznamenali maximální dosaženou odpověď. Tyto odpovědi jsme pak porovnávali nejprve v rámci jedné mutace, abychom zjistili, zda došlo k senzitivizaci receptoru a posléze jsme porovnali aktivitu mutantních receptorů s WT.

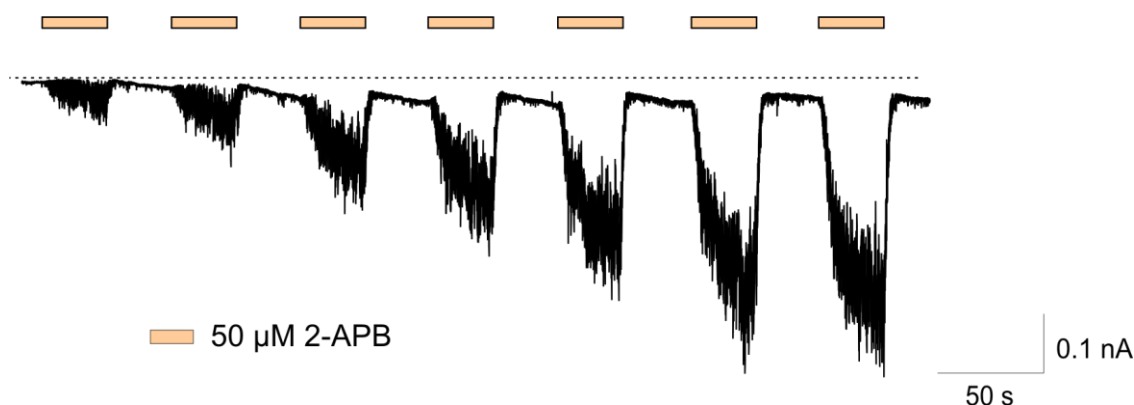
Teplotní aktivace: Při zjišťování role TRPV3 receptoru v teplotní citlivosti jsme zaznamenávali membránový proud, kdy jsme buňky vystavili lineárnímu zvyšování teploty protékajícího roztoku z 25°C na 58°C při konstantním membránovém potenciálu -70 mV. Teplotní práh aktivace TRPV3 receptoru jsme určovali pomocí Arrheniovy závislosti, přičemž tímto prahem je teplota, při které je Arrheniova závislost nelineární. Teplotní koeficient Q_{10} , který představuje míru změny chemického nebo biologického systému, která nastane jako důsledek změny teploty systému o 10 °C, jsme vypočítali podle vztahu $(I_2/I_1)^{10/(T_2-T_1)}$, kde I_1 a I_2 jsou amplitudy proudových odpovědí při teplotách T_1 a T_2 . Hodnoty teplotního koeficientu vyšší než 2 poukazují na teplotní citlivost iontového kanálu. Při vzrůstu teploty o 10 °C dochází u těchto kanálů k zvýšenému nárůstu vodivosti.

6 VÝSLEDKY

6.1 Základní charakterizace proudových odpovědí zprostředkovaných TRPV3 receptorem

Charakteristickou vlastností TRPV3 iontového kanálu je postupné zvyšování proudových odpovědí při opakované aplikaci agonisty (Peier et al., 2002, Xu et al., 2002, Chung et al., 2004). Touto unikátní vlastností se TRPV3 odlišuje od většiny ostatních TRP kanálů, které naopak postupně desenzitizují a ztrácejí citlivost k agonistům (Touska et al., 2011). Molekulární mechanismus senzitivace TRPV3 receptoru není doposud zcela objasněn. Jedna z nejpravděpodobnějších hypotéz je, že tento jev je způsoben postupným zvyšováním intracelulární koncentrace vápenatých iontů ($[Ca^{2+}]_i$) procházejících kanálem při aktivaci. Při nízké koncentraci $[Ca^{2+}]_i$ je na ankyrinovou doménu navázán kalmodulin (CaM), který blokuje aktivitu kanálu. Při vzrůstu intracelulárního Ca^{2+} dojde k jeho navázání na CaM a komplex Ca^{2+} -CaM je posléze uvolněn z ankyrinové domény, což zřejmě vede k senzitivaci TRPV3 receptoru (Xiao et al., 2008, Phelps et al., 2010).

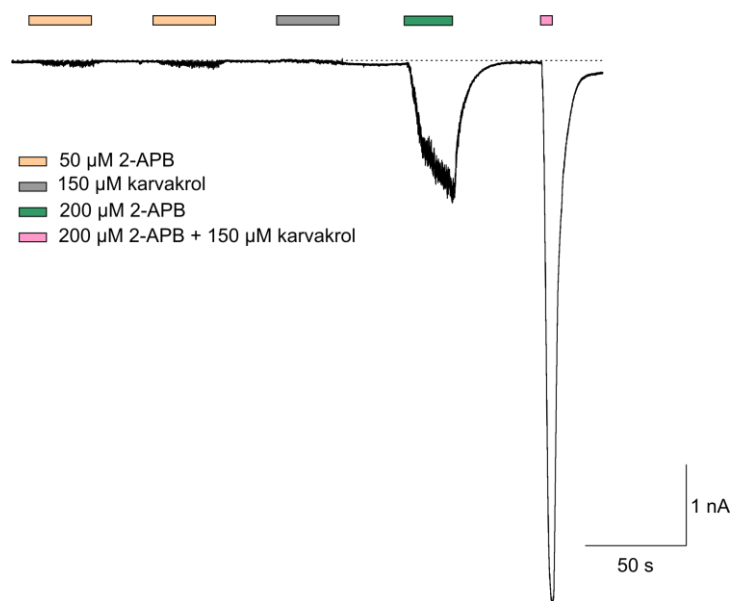
Naším prvním úkolem bylo funkčně ověřit tuto specifickou vlastnost TRPV3 receptoru u buněčné linie lidských imortalizovaných keratinocytů (HaCaT). Je známo, že keratinocyty přirozeně exprimují TRPV3, množství funkčních kanálů je však poměrně nízké a neumožňuje rutinní snímání membránových proudů tak, aby byly záznamy spolehlivě měřitelné. Předpokládali jsme navíc, že pro naši studii bude v dalším kroku nutné porovnání aktivity u různých mutantů TRPV3, což vyžaduje použití standardní koncentrace cDNA. Abychom zajistili dostatečnou expresi, HaCaT buňky jsme transfekovali lidským typem rekombinantního TRPV3 receptoru. Poté jsme vytvořili optimální protokol (obrázek 6.1), který umožnil zaznamenat odpovědi při opakované aplikaci nízké koncentrace klasického agonisty TRPV3 receptoru. 2-APB v koncentraci 50 μ M byl aplikován nejméně čtyřikrát po dobu 30 vteřin, mezi jednotlivými aplikacemi byla buňka omývána 30 s standardním extracelulárním roztokem. Membránový potenciál byl udržován na -70 mV.



Obrázek 6.1 Postupná senzitivace TRPV3 iontového kanálu exprimovaného v HaCaT buňkách. Záznam proudových odpovědí TRPV3 na opakované aplikace nízké koncentrace agonisty (50 μ M 2-APB). Membránové proudy byly snímány na membránovém potenciálu -70 mV.

Všechny buňky, které exprimovaly funkční TRPV3 kanál, konzistentně vykazovaly výraznou senzitivaci proudových odpovědí, přičemž amplituda čtvrté odpovědi na 50 μ M 2-APB dosahovala 4.8 ± 0.9 - násobného zvýšení oproti první odpovědi ($n = 25$). Prokázali jsme tak, že lidský TRPV3 receptor heterologně exprimovaný v HaCaT buňkách vykazuje senzitivaci, která je v souladu s údaji dostupnými v literatuře, a proto je tento model vhodný pro naše další experimenty.

Charakteristickou vlastností mnoha TRP kanálů je synergický účinek společného působení dvou různých aktivátorů, které samostatně nedostačují k plné aktivaci, zatímco jejich směs aktivuje receptor mnohem více než součet jednotlivých účinků. V případě TRPV3 jsme zjišťovali vliv dvou plných agonistů aplikovaných samostatně a posléze jsme sledovali jejich účinek při společné aplikaci. Použili jsme klasický (nespecifický) aktivátor TRPV3 receptoru 2-APB v koncentraci 200 μ M, což je saturující koncentrace ($EC_{50} = 28$ μ M) (Chung et al., 2004). Jako druhého agonistu jsme použili přírodní monoterpen karvakrol v koncentraci 150 μ M (tj. koncentrace nižší než poloviční účinná koncentrace $EC_{50} = 0.5$ mM) (Xu et al., 2006). Při jednotlivém působení agonistů bylo dosaženo jen nízké aktivity TRPV3 iontového kanálu (obrázek 6.2). Naproti tomu při společné aplikaci 2-APB a karvakrolu jsme pozorovali robustní, rychle aktivované proudové odpovědi, jejichž amplituda dosahovala několik nanoampér (5.5 ± 0.6 nA; $n = 23$).



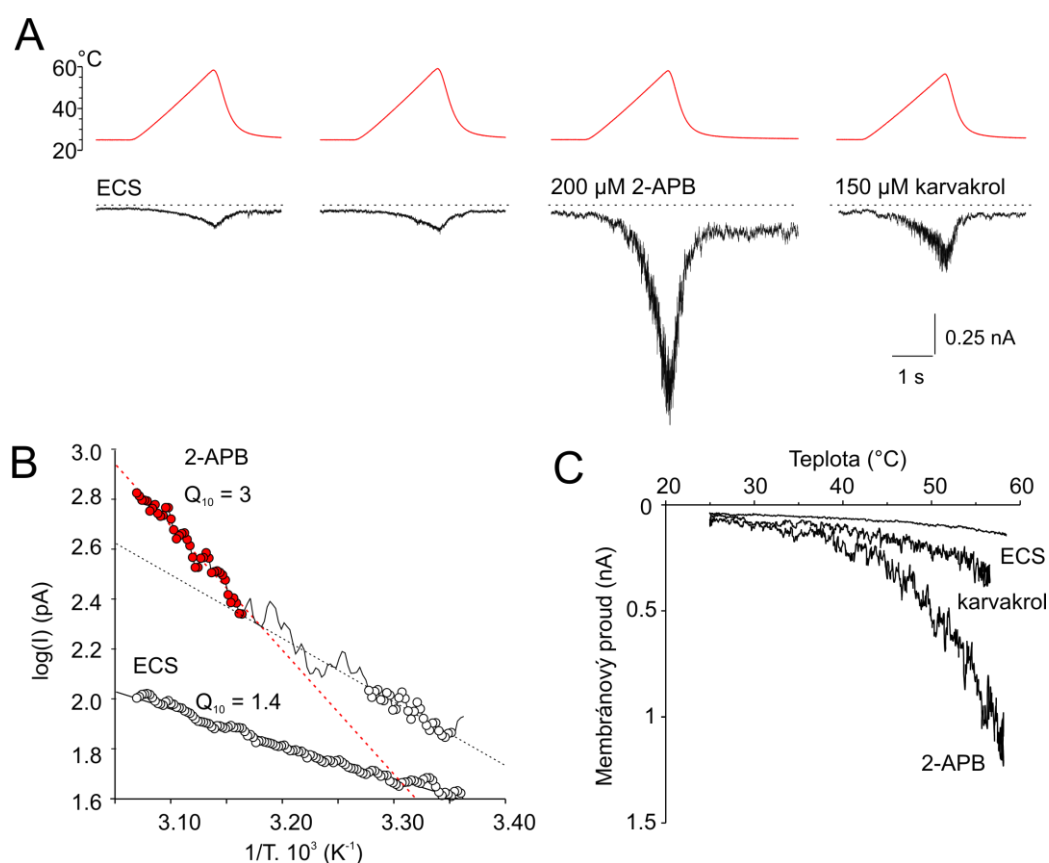
Obrázek 6.2 Maximální proudová odpověď TRPV3 receptoru vyvolaná synergií chemických agonistů. Dvěma aplikacemi roztoku s nízkou koncentrací 50 μM 2-APB jsme ověřili, že buňka exprimuje TRPV3 receptor. Poté jsme aplikovali postupně 150 μM karvakrol a 200 μM 2-APB po dobu 30 s. Maximální aktivity kanálu bylo dosaženo při aplikaci koncentrované směsi agonistů (150 μM karvakrol + 200 μM 2-APB).

Úvodní série našich experimentů potvrdila, že lidský TRPV3 exprimovaný v HaCaT buňkách má vlastnosti popisované v literatuře a je vhodným modelem pro studium molekulárních mechanismů senzitivace. Na základě pokusů, které měly za cíl ověřit míru synergického účinku jednotlivých agonistů, jsme určili optimální koncentrace těchto látek, které je třeba použít v dalších experimentech pro porovnání míry senzitivace TRPV3 ve vztahu k maximální odpovědi.

6.2 TRPV3 iontový kanál jako teplotní receptor

Přestože fyziologická úloha TRPV3 receptoru v detekci okolní teploty nebyla jednoznačně prokázána, rekombinantní iontový kanál lze za určitých podmínek aktivovat zvýšenou teplotou. Zjišťovali jsme, zda lidský TRPV3 receptor exprimovaný v HaCaT buňkách lze teplotně aktivovat. Snímali jsme membránové proudy na membránovém potenciálu -70 mV za současného zvyšování teploty roztoků omývajících snímanou buňku (obrázek 6.3). V kontrolním extracelulárním roztoku jsme při lineárním zvýšení teploty z 25°C na 58°C pozorovali jen mírné zvýšení amplitudy (~150 pA) membránového proudu a při opakování teplotního podnětu se odpovědi nezvyšovaly. Závislost proudu na teplotě

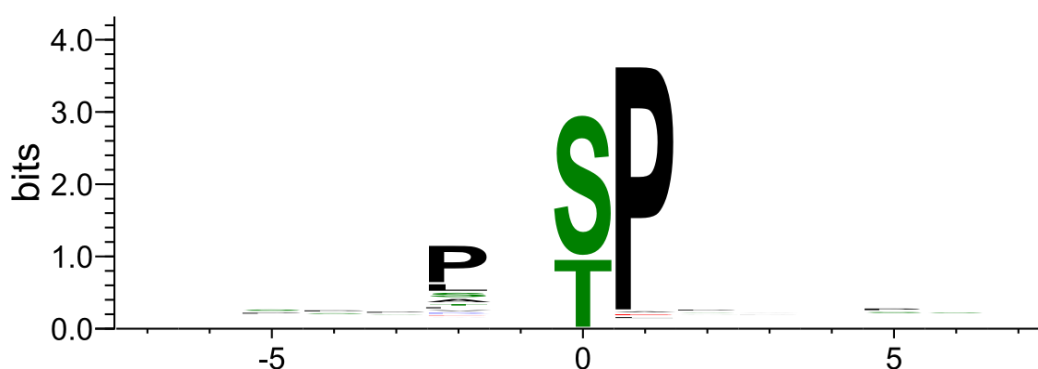
vyjádřená Arrheniovým vztahem byla lineární v celém teplotním rozsahu a charakterizována velmi nízkým teplotním koeficientem (1.4), což naznačuje, že TRPV3 není za daných podmínek specificky aktivován teplem. Naproti tomu v přítomnosti agonistů (2-APB nebo karvakrolu) byly odpovědi na teplo mnohonásobně zvýšeny. Tento výsledek může znamenat, že TRPV3 nelze v prostředí HaCaT buněk teplotně aktivovat bez přítomnosti dalších agonistů, nebo jej nelze teplotně aktivovat v prostředí vápenatých iontů (ECS obsahuje 1 mM Ca^{2+}).



Obrázek 6.3 Rekombinantní lidský TRPV3 exprimovaný v HaCaT buňkách není aktivován zvýšením teploty extracelulárního roztoku. (A) Whole-cell záznam membránových proudů, snímaných na membránovém potenciálu -70 mV, vyvolaných zvýšením teploty roztoků aplikovaných v uvedeném pořadí na HaCaT buňku transfekovanou TRPV3. Červeně jsou vyznačeny záznamy teploty, snímané termočlánkem umístěným v ústí aplikační pipety. Teplem zvýšené membránové proudy jsou výrazně potencovány v přítomnosti $200 \mu\text{M}$ 2-APB, nebo $150 \mu\text{M}$ karvakrolu. (B) Arrheniův vztah mezi teplotou a membránovým proudem změřeným v kontrolním extracelulárním roztoku a v přítomnosti 2-APB. Na ose x je vynesena převrácená hodnota absolutní teploty, na ose y je vynesena logaritmus absolutní hodnoty proudové odpovědi při zvýšení teploty z 25 na 58°C . Směrnice v ECS odpovídá teplotnímu koeficientu 1,4; v přítomnosti 2-APB je teplotní koeficient roven 3 (vypočten v rozsahu teplot 43 – 58°C podle vzorce $(I_2/I_1)^{10/(T_2-T_1)}$; kde I_i je amplituda proudu při dané absolutní teplotě T_i). (C) Teplotní závislost proudů v kontrolním ECS, 2-APB a karvakrolu.

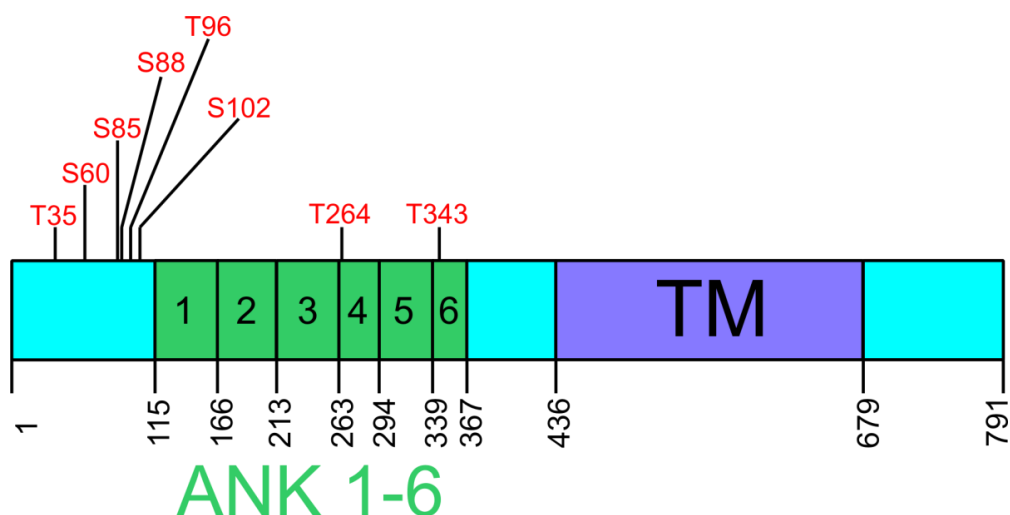
6.3 Potenciální místa pro fosforylaci TRPV3 receptoru ERK kinázou

Na základě předchozích pokusů provedených v naší laboratoři jsme ověřovali hypotézu, že funkce TRPV3 iontového kanálu může být regulována přímou fosforylací ERK kinázou. Možnost takového mechanismu podporuje i nedávné pozorování autorů Shen a spol. (2011), kteří prokázali přímou fosforylaci ERK kinázou u TRPC6 iontového kanálu v HEK293 buňkách. Všeobecně známý konsensuální motiv pro fosforylaci ERK kinázou je sekvence aminokyselin (Pro – X – Ser nebo Thr – Pro) (obrázek 6.4).



Obrázek 6.4 ERK fosforylační konsensus. Charakteristická a relativně konzervovaná sekvence aminokyselin na proteinu ukazující fosforylační místo ERK kinázy. Velikost písmen vyjadřuje pravděpodobnostní výskyt aminokyseliny na dané pozici. Pro ERK kinázu je nejpravděpodobnější uspořádání aminokyselin: Pro – X – Ser nebo Thr – Pro.

Pomocí predikčních fosforylačních serverů a programů jsme určili osm možných cílů v sekvenci lidského TRPV3 receptoru, které by mohly být fosforylovány ERK kinázou. Čtyři nalezené motivy obsahují serin (S60, S85, S88, S102) a čtyři treonin (T35, T96, T264, T343), dva z nalezených konsensuálních motivů (T264, T343) jsou součástí 4. a 6. repetice ankyrinové domény, jež je predikovaným místem pro protein – proteinové interakce (obrázek 6.5). Výčet nalezených potenciálních fosforylačních míst a skóre podle jednotlivých predikčních serverů jsou uvedeny v tabulce 1.



Obrázek 6.5 Obecné schéma TRPV3 receptoru s vyznačenými rezidui pro fosforylaci. Na schematickém obrázku je červeně vyznačeno osm predikovaných reziduí pro možnou fosforylaci TRPV3 receptoru, jež by se mohla účastnit signalizační dráhy ovlivňující aktivitu tohoto receptoru. Šest z nich (T35, S60, S85, S88, T96, S102) se nachází na N-konci mimo ankyrinovou doménu a dvě predikovaná místa (T264, T343) jsou obsažena v kritických ankyrinových repetitcích na N-konci.

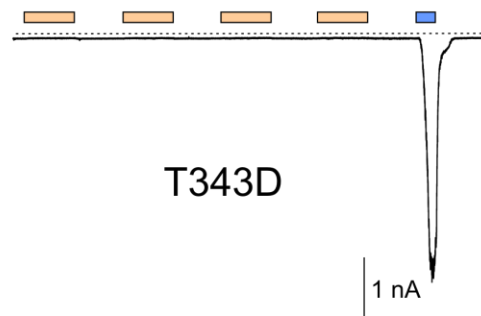
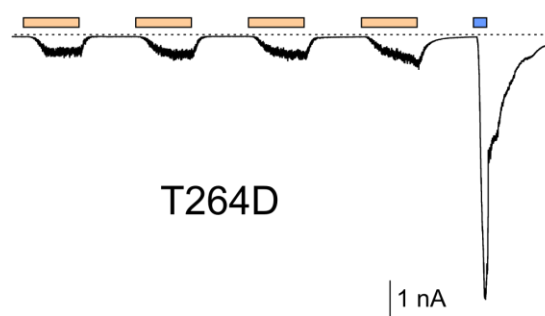
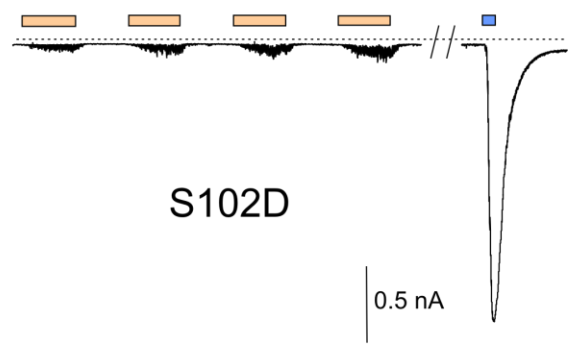
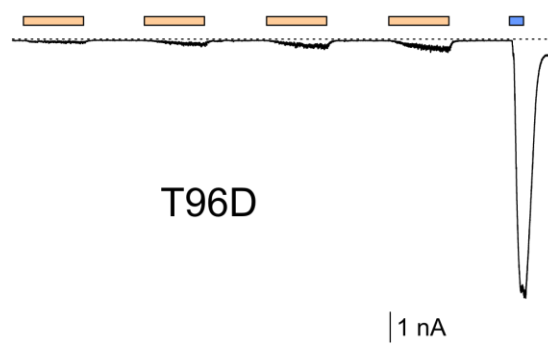
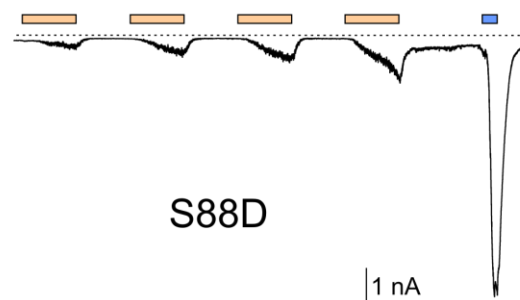
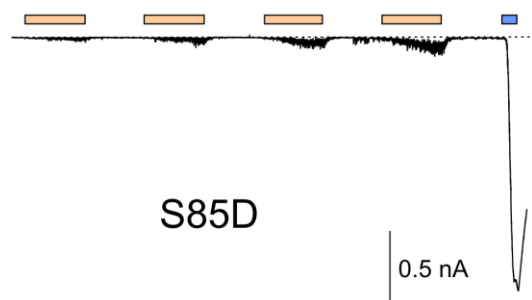
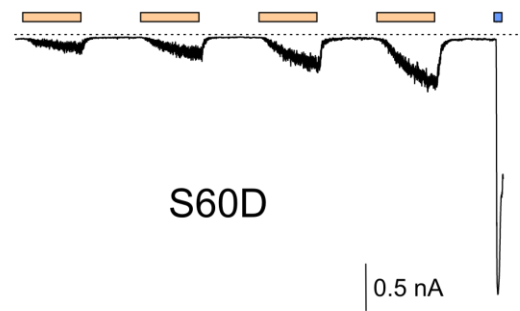
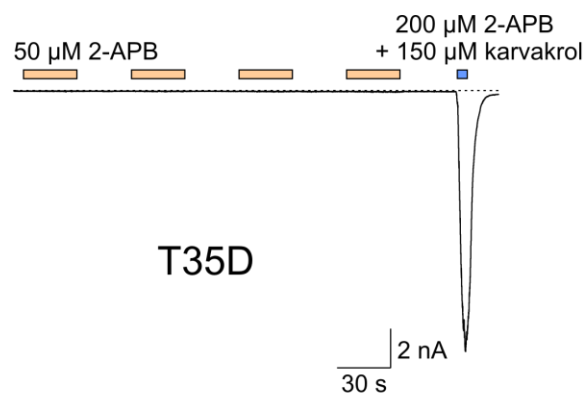
Rezidua	Predikční servery					
	NetWorKin MAPK3	Kinase Phos2 SMW score	PPSP Risk-Diff	GPS 2.1 medium	MUSITE	NetPhorest MAPK 1/3/7
T35	1.0	-	8.12	6.257	1.70 99.03 %	0.13
S60	1.66	0.767	7.39	7.054	1.37 97.35 %	0.23
S85	1.0	0.510	6.19	5.204	0.97 94.36 %	0.14
S88	1.42	0.515	9.58	9.713	1.88 99.45 %	0.17
T96	1.41	-	7.47	5.88	1.45 97.89 %	0.16
S102	1.76	0.682	9.2	9.12	1.85 99.41 %	0.26
T264	-	-	-	6.793	0.98 94.43 %	-
T343	1.4	-	6.90	4.617	1.68 98.92 %	0.15

Tabulka 1 Skóre a výčet reziduí TRPV3 receptoru, jež mohou být potenciálně fosforylována ERK kinázou. Osm reziduí bylo určeno na základě ERK konsensu a pomocí šesti predikčních serverů, které tyto pozice s uvedeným skóre vyhodnotily jako možné cíle ERK kinázy.

6.4 Vytvoření bodových mutací a jejich funkční ověření metodou patch-clamp

Po stanovení reziduí, která mohou s největší pravděpodobností představovat fosforylační místa pro ERK, jsme vytvořili osm mutací s bodovou záměnou v serinu nebo treoninu a nahradili jsme je za kyselinu asparagovou. Tuto aminokyselinu jsme zvolili kvůli jejímu záporně nabitému charakteru, který je dán dvěma karboxylovými skupinami. Předpokládali jsme, že tato vlastnost aminokyseliny bude mimikovat fosforylaci TRPV3 receptoru. Pokud by fosforylace byla příčinou zvýšené aktivity TRPV3 kanálu, očekávali jsme, že proudové odpovědi již na začátku měření budou zvýšené ve srovnání s divokým typem (WT). Pro funkční ověření jsme použili elektrofyzilogickou metodu patch-clamp v konfiguraci snímání proudů z celé buňky. Pro stimulaci jsme použili 2-APB a karvakrol v koncentracích, které byly stanoveny pilotními pokusy uvedenými v kapitole 6.1 jako optimální pro studium senzitivace i pro stanovení maximální odpovědi. Standardní protokol sestával ze čtyř aplikací nízké koncentrace 2-APB (50 μM) po dobu 30 s oddělených 30-s odmytím extracelulárním roztokem. Poté jsme aplikovali koncentrovanou směs agonistů (200 μM 2-APB a 150 μM karvakrol) pro zjištění maximální odpovědi. Membránový potenciál byl udržován konstantně na hodnotě -70 mV. Porovnávali jsme amplitudy odpovídajících proudových odpovědí naměřených u divokého typu TRPV3 receptoru s proudovými odpověďmi mutantních receptorů.

Reprezentativní záznamy jednotlivých mutací jsou zobrazeny na obrázku (6.6), na kterém jsou patrné funkční změny některých mutantů: Rezidua T35 a T343, která byla vyměněna za kyselinu asparagovou (T35D, T343D), vykazovala velmi nepatrné proudové odpovědi při aplikaci nízké koncentrace 2-APB (50 μM). Naopak u mutací na pozicích S88D a T264D si lze povšimnout, že při stejné aplikaci, odpovědi dosahují až stovky pA. Tento fakt byl posléze potvrzen i statisticky.

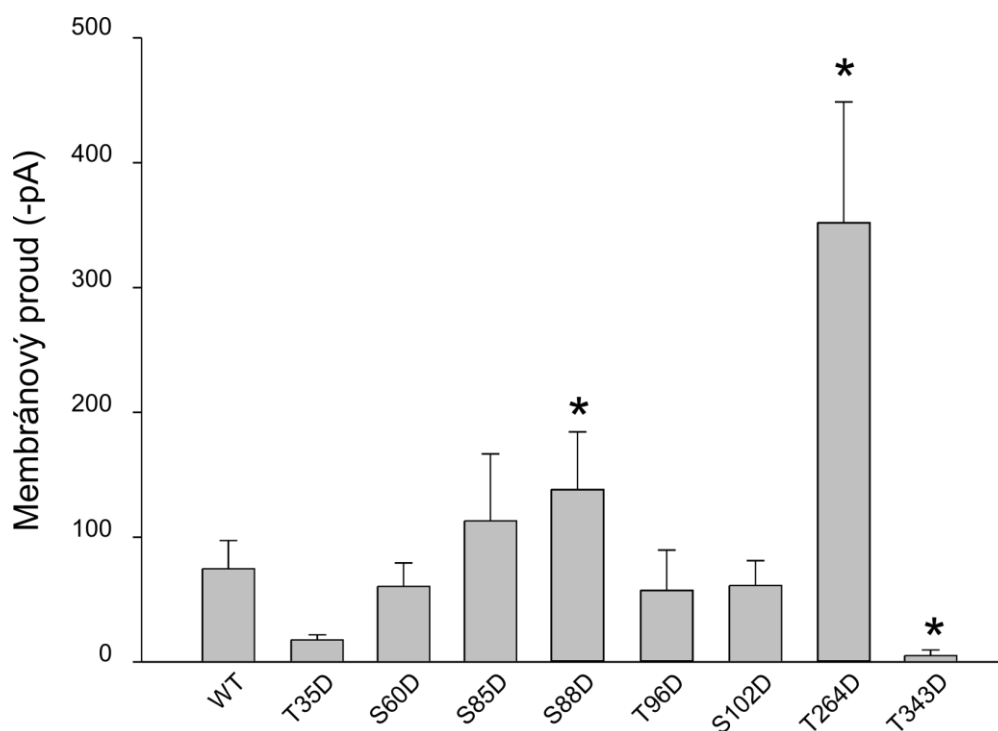


50 μ M 2-APB

200 μ M 2-APB + 150 μ M karvakrol

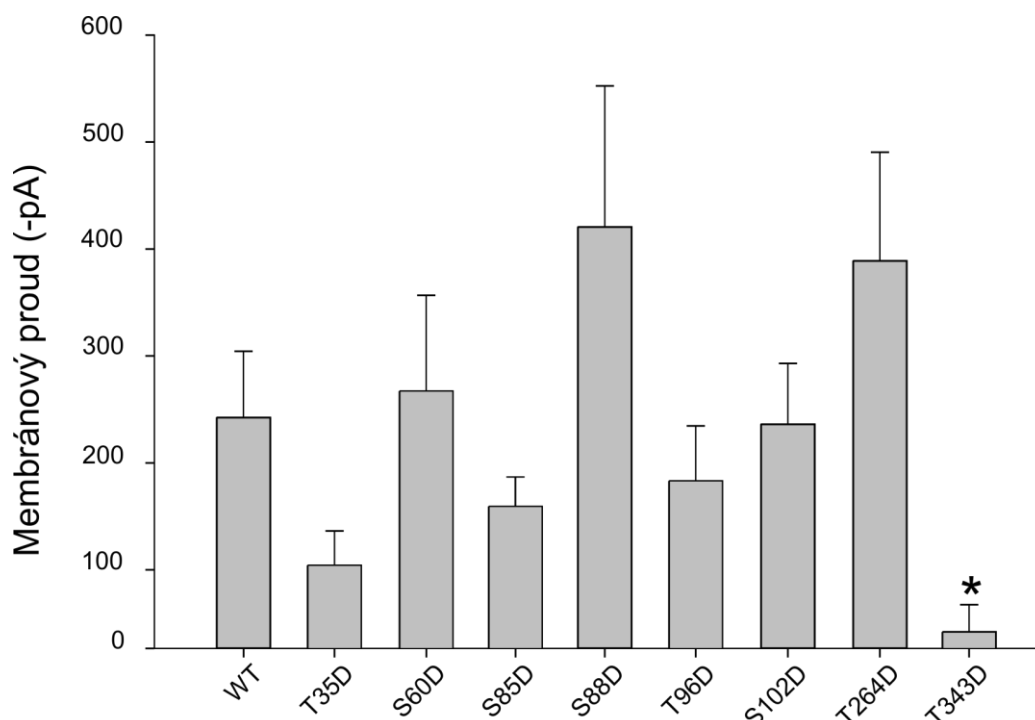
Obrázek 6.6 Chemická citlivost mutantních forem TRPV3 receptoru. Reprezentativní záznamy proudových odpovědí, změřené na buňkách exprimujících TRPV3 receptor, který obsahuje bodovou mutaci na jednom z vytypovaných reziduí, které by mohlo být fosforylováno ERK kinázou. Podle standardního protokolu byly buňky čtyřikrát vystaveny po dobu 30 s 50 μM 2-APB. Pro zjištění maximální odpovědi byla na buňky aplikována směs agonistů (200 μM 2-APB a 150 μM karvakrol). Vlastnosti některých mutací jsou patrné na reprezentativních záznamech. Například chybějící proudová odpověď mutantů T35D a T343D při aplikaci nízké koncentrace 2-APB, nebo naopak mohutná aktivita S88D a T264D.

Při statistickém hodnocení naměřených dat jsme se nejprve zaměřili na hodnoty získané z první aplikace nízké koncentrace 2-APB (50 μM) (graf 6.1). V sloupcovém grafu jsou zobrazeny průměrné hodnoty amplitudy prvních proudových odpovědí získaných na membránového potenciálu -70 mV. Z osmi mutantních forem jsme identifikovali tři, které se statisticky lišily ve srovnání s divokým typem. Statisticky významně se odlišovaly mutace na pozicích S88D ($P = 0.041$; $n = 10$) a T264D ($P = 0.003$; $n = 14$), které svou velikostí odpovědi převyšovaly divoký typ. V případě rezidua T264D došlo dokonce k několikanásobnému navýšení první odpovědi, což potvrzovalo naši domněnku, že kyselina asparagová svým záporným charakterem může mimikovat fosforylaci a kanál je od samotného začátku vysoce aktivní. Statisticky významný rozdíl byl nalezen také u mutantu T343D ($P = 0.015$; $n = 4$), u kterého jsme naměřili proudové odpovědi pohybující se pouze v jednotkách pA. Velice obdobným způsobem reagovaly na první aplikaci 2-APB buňky exprimující mutant T35D, snížení amplitudy však bylo vyhodnoceno na hranici statistické významnosti ($P = 0.057$; $n = 12$).



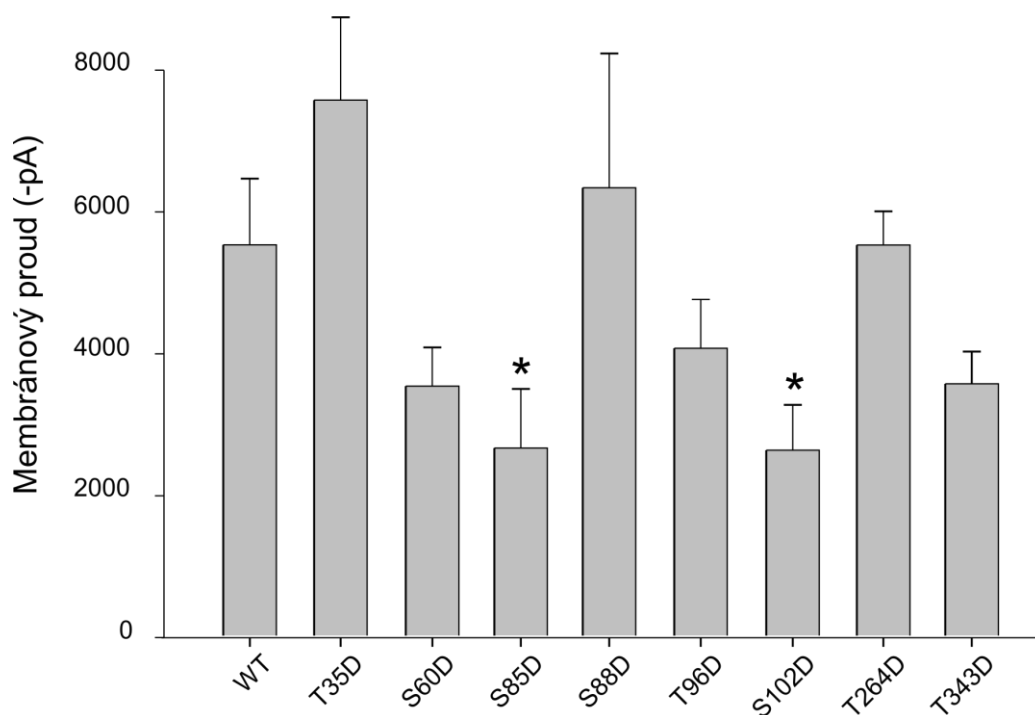
Graf 6.1 Účinek mutací na amplitudu první proudové odpovědi při aplikaci 2-APB ve srovnání s divokým typem. Průměrné amplitudy proudových odpovědí zaznamenaných na membránovém potenciálu -70 mV u jednotlivých mutantů při první aplikaci 50 μ M 2-APB. Hvězdičkou jsou označeny mutace se signifikantně změněnými hodnotami vztaženými vůči divokému typu (WT) (S88D, $P = 0.041$; $n = 10$, T264D, $P = 0.003$; $n = 14$; T343D, $P = 0.013$; $n = 4$).

Dalším parametrem, který byl statisticky porovnáván, byla velikost proudových odpovědí při čtvrté aplikaci 2-APB (graf 6.2). Statisticky významné snížení odpovědi na 4. aplikaci 2-APB bylo pozorováno u mutace na pozici T343D ($P = 0.015$; $n = 4$). Podobné snížení odpovědi vykazovala i mutace T35D. Naopak zvýšené proudové odpovědi byly pozorovány u S88D a T264D. Ačkoliv změny nedosahovaly statistické signifikance, pozorované zvýšení podpořilo naši hypotézu o zvýšené aktivitě mutantních TRPV3 receptorů, která by mohla být způsobená mutacemi mimikujícími fosforylaci.



Graf 6.2 Průměrné amplitudy proudových odpovědí konstruktů při čtvrté aplikaci 2-APB ve srovnání s divokým typem. Průměrné amplitudy odpovědí zaznamenaných na membránovém potenciálu -70 mV u jednotlivých mutací při čtvrté aplikaci 50 μ M 2-APB. Hvězdičkou je označena mutace se signifikantně změněnými hodnotami vztaženými vůči divokému typu (WT) (T343D, $P = 0.015$; $n = 4$).

Posledním hodnoceným parametrem byla průměrná amplituda proudových odpovědí na směs agonistů, která u divokého typu TRPV3 vyvolává maximální aktivitu (graf 6.3). Statisticky významně snížené hodnoty oproti WT byly zjištěny u mutantních konstruktů S85D ($P = 0.005$; $n = 8$) a S102D ($P = 0.007$; $n = 8$). Další zajímavé zjištění bylo, že mutace T35D, která vykazovala velmi nízké odpovědi na 50 μ M 2-APB, měla v porovnání s WT i ostatními konstrukty nejvyšší průměrnou amplitudu proudových odpovědí při aplikaci směsi agonistů. Aktivita mutantů S88D a T264D byla při aplikaci směsi 2-APB a karvakrolu srovnatelná s divokým typem, přestože při aplikaci nízké koncentrace 2-APB převyšovaly svými odpověďmi ostatní mutace i WT.



Graf 6.3 Účinek směsi agonistů 2-APB a karvakrolu na proudové odpovědi zprostředkované vytvořenými konstrukty ve srovnání s divokým typem. Průměrné amplitudy odpovědi jednotlivých mutantů při aplikaci směsi 200 μ M 2-APB a 150 μ M karvakrolu. Hvězdičkou jsou označeny mutace se signifikantně změněnými hodnotami vztaženými vůči divokému typu (WT) (S85D, $P = 0.005$; $n = 8$, S102D, $P = 0.007$; $n = 8$)

Výsledky našich pokusů ukázaly, že 6 z osmi navržených konstruktů se liší od divokého typu alespoň v jednom ze sledovaných parametrů:

1. Zatímco amplitudy první i čtvrté odpovědi T35D na nízkou koncentraci 2-APB byly jen obtížně měřitelné, v synergickém účinku směsi agonistů předčil tento mutant divoký typ TRPV3 (přestože nebylo dosaženo statistické významnosti rozdílu v jednotlivých parametrech).

2. S85D a S102D vykazovaly normální odpovědi na nízkou koncentraci 2-APB, měly však významně nižší odpovědi na směs 200 μ M 2-APB a 150 μ M karvakrolu.

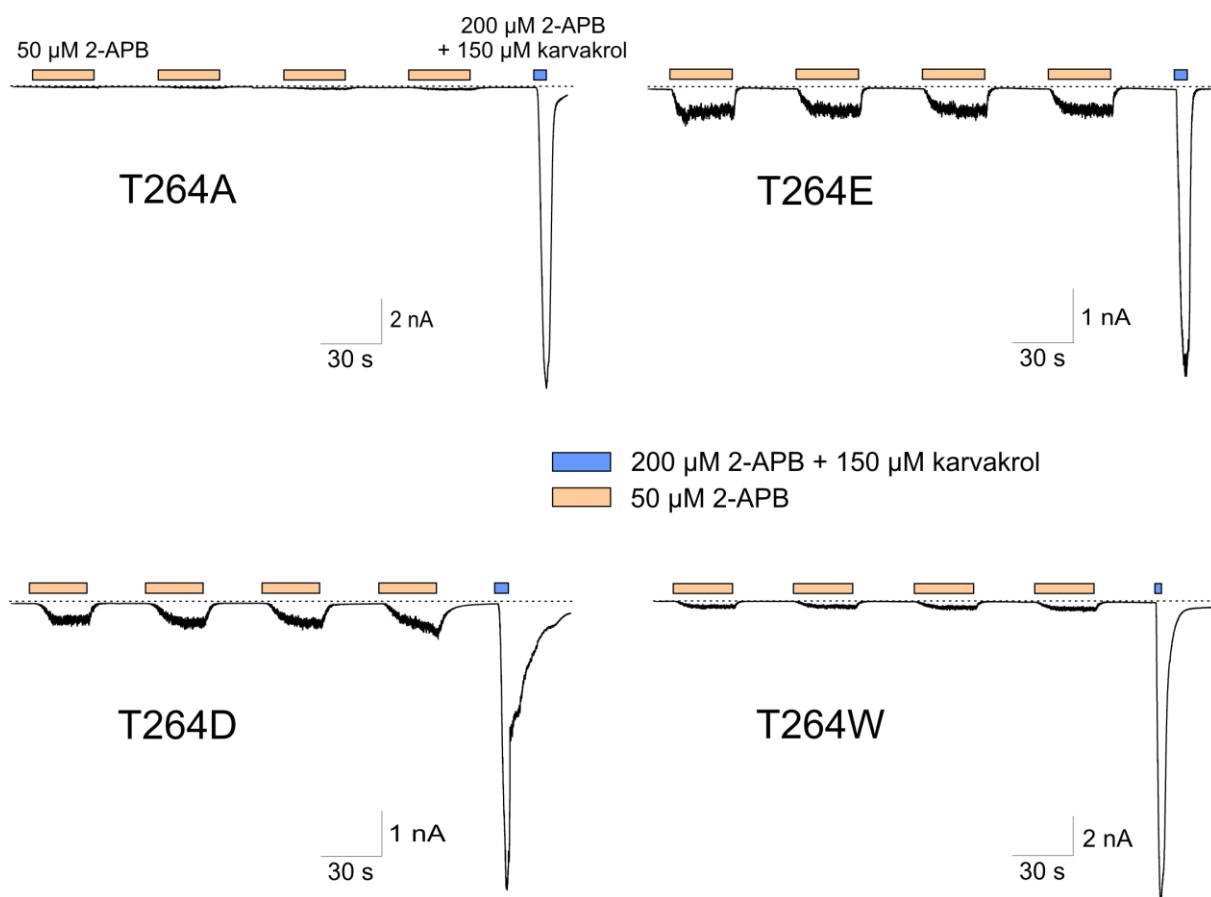
3. Mutanty S88D a T264D byly citlivější na nízkou koncentraci (50 μ M) 2-APB, zatímco v synergickém účinku směsi agonistů se nelišily od WT.

4. Mutace T343D vedla k radikálnímu snížení proudových odpovědí na nízkou koncentraci 2-APB a účinek směsi agonistů byl v průměru také nižší, přestože nikoliv statisticky významně.

5. Mutanty S60D a T96D se statisticky nelišily od WT, přestože první z uvedených konstruktů vykazoval nižší synergický účinek směsi obou agonistů.

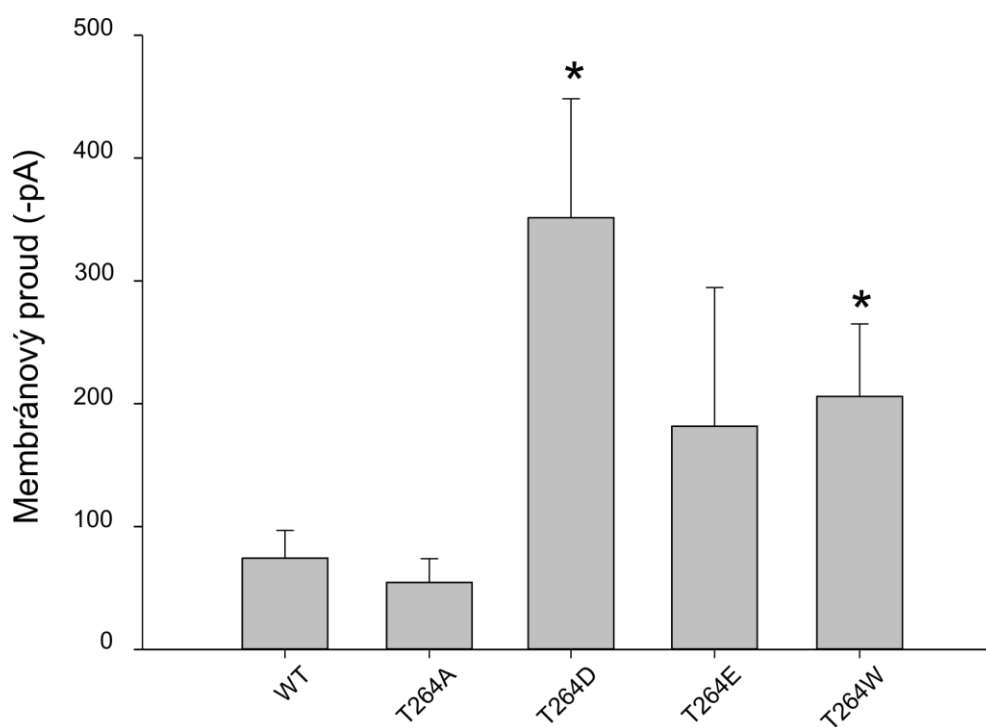
6.5 T264

Výsledky popsané v předchozí kapitole ukázaly, že T264 splňuje kritéria, podle kterých by tento aminokyselinový zbytek mohl představovat hledané místo pro fosforylaci TRPV3. Z hlediska námi ověřované hypotézy by mutace T264D mimikující fosforylaci mohla být tonicky senzitivována, což by se projevilo již v první odpovědi na 2-APB. Skutečně jsme u tohoto mutantu pozorovali několikanásobně zvýšenou aktivitu kanálů ve srovnání s divokým typem. V této představě nás dále podpořila lokalizace T264 v ankyrinové doméně, která je predikovaným místem pro protein – proteinové interakce. Proto jsme T264 postupně zaměnili za tři různé aminokyseliny s odlišnými fyzikálními vlastnostmi, abychom ověřili, zda účinek mutace je důsledkem změny náboje v této oblasti, nebo důsledkem lokální strukturní perturbace. Kromě mutace T264D jsme proto treonin vyměnili za alanin (T264A), malou, nepolární aminokyselinu, která se téměř nikdy nepodílí na funkci proteinu přímo, dále za kyselinu glutamovou (T264E), která stejně jako kyselina asparagová obsahuje dvě karboxylové skupiny a může mimikovat fosforylovaný stav, a nakonec za tryptofan (T264W), nepolární, poměrně velkou aminokyselinu s aromatickým jádrem. Funkční ověření mutantů jsme opět prováděli technikou patch-clamp. Reprezentativní záznamy jsou na obrázku (6.7), na kterých jsou viditelné zvýšené proudové amplitudy mutací T264E, T264D, T264W a naproti tomu nízká aktivita mutace T264A při aplikaci 50 μ M 2-APB.



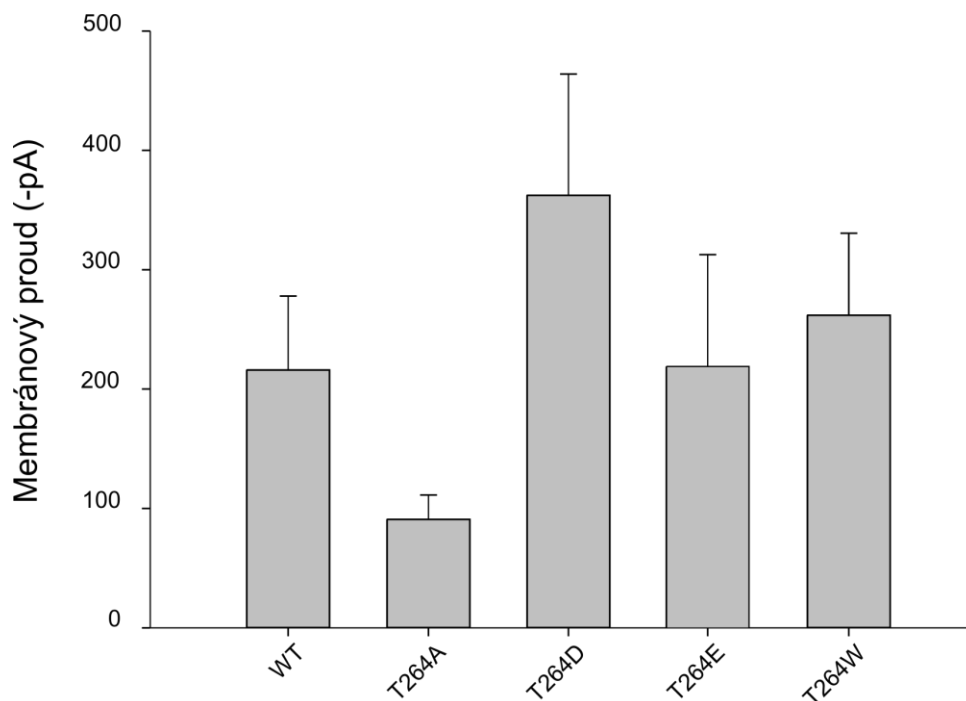
Obrázek 6.7 Chemická citlivost TRPV3 receptorů s mutacemi na pozici T264. Obrázek znázorňuje čtyři reprezentativní záznamy proudových odpovědí, změřených na buňkách exprimujících TRPV3 receptor, který obsahuje bodovou mutaci na pozici T264 (T264A, T264E, T264D, T264W). T264 jsme na základě předchozích výsledků vybrali jako nejvhodnějšího kandidáta na místo možné fosforylace ERK kinázou a tuto možnost jsme chtěli potvrdit vytvořením dalších mutací na této pozici. Podle vytvořeného protokolu byly buňky čtyřikrát vystaveny 50 μ M 2-APB a pro zjištění maximální odpovědi byla na buňky aplikována směs agonistů (200 μ M 2-APB a 150 μ M karvakrol).

Na buňky byl aplikován standardní stimulační protokol, sestávající ze čtyř aplikací 50 μM 2-APB a posléze aplikace směsi 200 μM 2-APB a 150 μM karvakrolu. Odpovědi zprostředkované mutantními TRPV3-T264W kanály svou amplitudou převyšovaly odpovědi divokého typu. Nikoliv statisticky významně, ale též vyšší amplitudu proudových odpovědí vykazovaly mutantní formy T264E. Naproti tomu T264A konstrukt se svou odpovědí podobal divokému typu (graf 6.4).



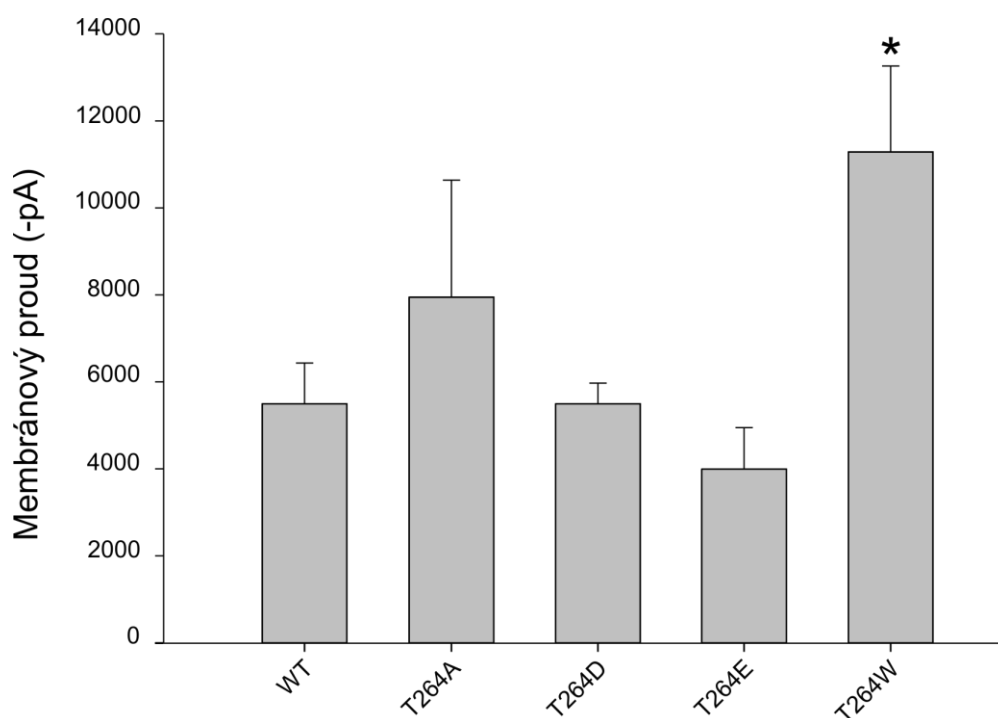
Graf 6.4 Účinek první aplikace 2-APB na vytvořené konstrukty ve srovnání s divokým typem. Průměrné amplitudy proudových odpovědí u jednotlivých mutantů při první aplikaci 50 μM 2-APB. Hvězdičkou jsou označeny mutace se signifikantně vyššími hodnotami vztaženými vůči WT (T264D, $P = 0.003$; $n = 14$; T264W, $P = 0.013$; $n = 5$).

Amplitudy proudových odpovědí při čtvrté aplikaci 2-APB byly zvýšeny u T264D a sníženy u T264A, statistická analýza však neprokázala statisticky významný rozdíl od divokého typu (graf 6.5).



Graf 6.5 Účinek čtvrté aplikace 2-APB na vytvořené konstrukty ve srovnání s divokým typem. Průměrné amplitudy jednotlivých mutací při čtvrté aplikaci 50 μ M 2-APB.

Maximální proudové odpovědi byly zřetelně zvýšeny u konstruktu T264W ($P = 0.011$; $n = 6$), který vykazoval vyšší odpovědi také při předchozích aplikacích 2-APB. Naproti tomu mutace T264A, která působila nízkou aktivitou při předchozích aplikacích 2-APB, reagovala na směs agonistů zvýšenou proudovou odpovědí ve srovnání s WT. T264D a T264E měly srovnatelnou amplitudu odpovědi s divokým typem (graf 6.6).



Graf 6.6 Účinek směsi agonistů 2-APB a karvakrolu na vytvořené konstrukty ve srovnání s divokým typem. Průměrné amplitudy jednotlivých mutací při aplikaci směsi 200 μM 2-APB a 150 μM karvakrolu. Hvězdičkou je označena mutace se signifikantně změněnými hodnotami vztaženými vůči divokému typu (T264W, $P = 0.011$; $n = 6$)

7 DISKUZE

7.1 Charakteristické vlastnosti TRPV3

V první části diplomové práce jsme se zaměřili na charakteristické vlastnosti TRPV3 receptoru, které jsou popsány v literatuře. První typická vlastnost tohoto iontového kanálu je jeho postupná senzitivace při opakované aplikaci agonisty. Tento popsáný jev se nám podařilo potvrdit na buněčné linii lidských imortalizovaných keratinocytů (HaCaT), které přirozeně exprimují TRPV3 receptor. Pro zajištění dostatečné exprese jsme HaCaT buňky transfekovali lidským typem rekombinantního TRPV3 receptoru. Při měření elektrofyzilogickou metodou patch-clamp jsme zaznamenali až sedm po sobě následujících proudových odpovědí, které vzestupně zvyšovaly svoji amplitudu. Druhou vlastností, kterou nedisponuje jen TRPV3 iontový kanál, ale i další TRP kanály, je synergické působení dvou aktivátorů. Vliv samotného agonisty nezajistí maximální proudovou odpověď iontového kanálu, avšak při aplikaci směsi dvou agonistů a při jejich společném působení lze dosáhnout maximální aktivity kanálu. I tuto vlastnost se podařilo u TRPV3 receptoru exprimovaného v HaCaT buňkách prokázat. Pro oba typy pokusů jsme použili chemické aktivátory tohoto receptoru: 2-APB a karvakrol. Těmito experimenty jsme potvrdili, že rekombinantní lidský TRPV3 kanál exprimovaný v HaCaT buňkách je vhodným modelem pro další výzkum TRPV3 receptoru. Podařilo se nalézt optimální koncentrace agonistů tak, abychom se mohli v dalších experimentech zaměřit na studium senzitivace TRPV3 související s úlohou potenciálních míst pro fosforylaci ERK kinázou.

7.2 Synergické působení chemického a tepelného podnětu

Ukázali jsme, že v kontrolním extracelulárním roztoku, který obsahuje vápenaté ionty, není rekombinantní TRPV3 aktivován teplem v rozsahu 25-58°C. Závislost proudu na teplotě vyjádřená Arrheniovým vztahem je v tomto intervalu teplot lineární a svědčí o nesespecifickém teplotně-závislém zvýšení odpovědi. Naproti tomu TRPV3 je aktivován teplem za současného působení chemického podnětu (2-APB nebo karvakrol). Přestože podrobnější charakterizace teplotně vyvolaných odpovědí by vyžadovala další cílené experimentální ověření, které není předmětem předložené diplomové práce, podařilo se nám ukázat, že v prostředí HaCaT buněk lze rekombinantní TRPV3 teplotně aktivovat pouze v přítomnosti chemických agonistů.

7.3 Určení potenciálních míst TRPV3 receptoru pro fosforylaci ERK kinázou a jejich funkční ověření technikou patch-clamp

Hlavním cílem této diplomové práce bylo určit potenciální místo TRPV3 receptoru, které by mohlo být fosforylováno ERK kinázou. Na začátku signalizační dráhy, které je ERK kináza součástí, je aktivovaný EGFR receptor s tyrosin-kinázovou aktivitou, který spouští signální kaskádu EGFR/MAPK, na jejímž konci ERK kináza fosforyluje TRPV3 receptor. K aktivaci EGFR receptoru dochází pomocí růstového faktoru EGF nebo mitogenního polypeptidu TGF- α . A právě vztah mezi růstovým faktorem EGF a TRPV3 receptorem byl již dříve studován v naší laboratoři. Ukázalo se, že EGF senzitivizuje TRPV3 receptor. Naproti tomu inhibicí MAP kinázové kaskády, která je spouštěna EGF receptorem, došlo k potlačení stimulačních účinků EGF a k snížení aktivity TRPV3 iontového kanálu. Tato práce na tento výzkum navazuje a snaží se zjistit, zda konečný efektor MAP kinázové dráhy, ERK kináza, může regulovat TRPV3 receptor fosforylací.

Potenciální místa fosforylace TRPV3 receptoru ERK kinázou jsme nejprve určili teoreticky. Pro určení potenciálních pozic jsme v literatuře vyhledali konsensus ERK kinázy (Pro – X – Ser nebo Thr – Pro), který nám napověděl, na jaké pořadí aminokyselin se v sekvenci TRPV3 receptoru máme soustředit. Poté jsme využili predikčních programů a serverů, které určily osm potenciálních míst TRPV3 proteinu, jež by mohla ERK kináza fosforylovat. Všech osm míst se nachází na intracelulárně uloženém N-konci, přičemž na čtyřech pozicích se nachází serin (S60, S85, S88, S102) a na čtyřech treonin (T35, T96, T264, T343).

Na těchto místech jsme postupně vytvořili bodové mutace. Treonin nebo serin jsme zaměnili za kyselinu asparagovou, která svým záporným charakterem může mimikovat fosforylaci daného místa a zvýšit tak aktivitu mutovaného TRPV3 receptoru, což by se již na začátku měření projevilo zvýšenou proudovou odpovědí ve srovnání s divokým typem. Pro funkční ověření proudových amplitud mutantních forem TRPV3 receptoru jsme použili techniku patch-clamp a agonisty tohoto iontového kanálu prověřené při úvodních pokusech.

7.4 Možné úlohy predikovaných reziduí v signalizační dráze TRPV3 iontového kanálu

Při hodnocení dat jsme se zaměřili na proudové odpovědi při první a čtvrté aplikaci samotného 2-APB a na amplitudu při aplikaci směsi agonistů. Zaznamenané hodnoty jsme

pak vztahovali vůči WT. Kromě toho jsme porovnávali proudové odpovědi jednotlivých mutací mezi první a čtvrtou aplikací 2-APB abychom zjistili, zda došlo k senzitivaci kanálu. Největší pozornost jsme však věnovali hodnotám naměřeným při první aplikaci 2-APB. První proudová odpověď pro nás byla důležitá z hlediska naší domněnky, která spočívala v tom, že již při první aplikaci se některá z mutací projeví svou zvýšenou aktivitou ve srovnání s wild-typem, což bude výsledkem kyseliny asparagové mimikující fosforylaci.

S60D, T96D: U mutací na těchto pozicích jsme nezaznamenali signifikantně odlišné hodnoty a ve všech třech hodnocených případech vykazovaly totožné chování jako WT.

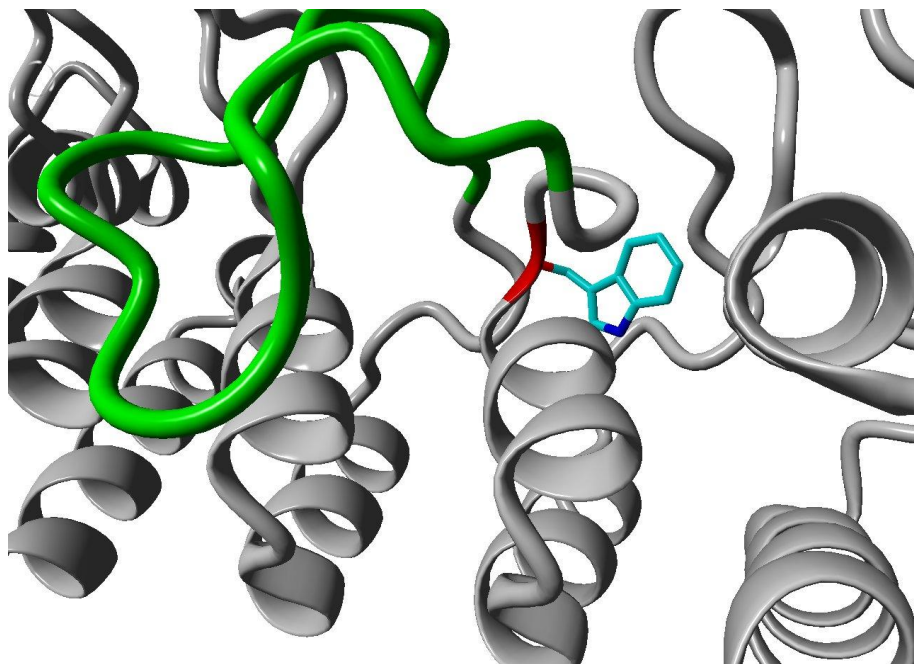
S85D, S102D: Statisticky významné změny v amplitudě proudových odpovědí mutantních forem S85D a S102D nás přivedly k otázce, na jakých místech karvakrol působí na TRPV3 receptor? Proudové amplitudy při aplikacích 2-APB nikterak nenasvědčovaly tomu, že by se tyto dvě mutace lišily od divokého typu. Až při aplikaci směsi agonistů jsme zaznamenali významně sníženou proudovou odpověď ve srovnání s WT. Domníváme se tedy, že došlo k špatnému převodu synergického účinku dvou aktivátorů s tím, že doposud v literatuře nebylo popsáno místo, kde karvakrol na TRPV3 receptor působí. V souladu s touto představou by tedy mutace na těchto místech mohly způsobit sníženou citlivost ke karvakrolu. Na naše výsledky by tak mohly navázat další studie, které by přispěly k upřesnění molekulární podstaty aktivace TRPV3.

S88D: Tato mutace ve všech třech hodnocených proudových odpovědích svojí amplitudou převyšovala WT, při první aplikaci 2-APB dokonce signifikantně. Splňovala tedy náš předpoklad, avšak při porovnání první a čtvrté proudové odpovědi se ukázalo, že došlo k senzitivaci kanálu, což znamená, že mutantní TRPV3 receptor nebyl od samého začátku "předaktivován" a to vyřadilo tuto mutaci z kandidatury na pozici, která by mohla být fosforylována ERK kinázou. Zvýšenou aktivitu S88D kanálů si vysvětlujeme zvýšenou expresí probíhající v časovém rozmezí od transfekce buněk po začátek měření.

T264D, T264E: Nejzajímavější výsledky přinesly mutace na pozici T264, konkrétně při záměně treoninu za kyselinu asparagovou a glutamovou. Tyto dvě mutace plně potvrdily naši teorii o předaktivovanosti iontového kanálu. Karboxylová skupina v postranním řetězci těchto dvou aminokyselin totiž mimikovala záporný charakter fosforylace, což se ukázalo již při první aplikaci 2-APB. První proudová odpověď obou mutací byla oproti WT zvýšená a v případě kyseliny asparagové dokonce mnohonásobně. Porovnání první a čtvrté amplitudy těchto jednotlivých mutací párovým testem ukázalo, že mezi těmito odpověďmi nedošlo k signifikantnímu nárůstu proudové odpovědi, což znamená, že tyto mutantní formy TRPV3

receptoru byly od samého začátku senzitivizované. Proto se zdá, že pozice T264 by s velkou pravděpodobností mohla být cílem ERK kinázy. V tomto tvrzení nás dále upevňuje poloha cílového treoninu, který se nachází v citlivé ankyrinové doméně. Krystal ARD TRPV3 receptoru, který byl vytvořen v roce 2013 (Shi et al., 2013) dokonce ukázal, že reziduum T264 se nachází schované pod rigidní kličkou mezi třetí a čtvrtou ankyrinovu repeticí (tzv. Finger 3), přičemž tato atypická klička mezi TRPV receptory je zřejmě důležitým místem pro funkčnost TRPV3 kanálu. Vědecká skupina, jež tento krystal vytvořila, se domnívá, že tato klička a její možné konformace jsou kritické pro vazbu CaM a ATP, které se podílí na regulaci aktivity tohoto kanálu. Kromě toho tato skupina vytvořila v oblasti kličky několik mutací, po kterých byla pozorována zvýšená nebo snížená aktivita kanálu při stimulaci 2-APB. To tedy naznačuje, že i námi zkoumané reziduum T264 by mohlo být důležitým regulačním místem TRPV3 receptoru, které je chráněno již zmiňovanou kličkou.

T264W: Zajímavé výsledky na pozici T264 jsme zaznamenali i při výměně treoninu za tryptofan. Tato mutace přinesla signifikantní změny v první proudové odpovědi a při aplikaci směsi agonistů, kdy byla proudová odpověď jednou tak vyšší než u WT. U čtvrté proudové odpovědi nebyla zaznamenána statisticky významně změněná hodnota, ovšem párový test mezi první a čtvrtou odpovědí ukázal na postupný růst aktivity kanálu. Podobné chování vykazovala již výše zmíněná mutace S88D, proto i v tomto případě mohlo vlivem mutace dojít ke zvýšení exprese funkčních kanálů v době od transfekce buněk po začátek pokusu. Kromě toho by však za zvýšení amplitudy proudových odpovědí mohla i sterická interakce tryptofanu s jinými podstrukturami ankyrinové domény, nebo by tryptofan díky velikosti postranního řetězce mohl způsobit změnu konformace zmiňované kličky (obrázek 7.1) mezi třetí a čtvrtou repeticí ankyrinové domény.



Obrázek 7.1 Krystal ankyrinové domény TRPV3 receptoru (Shi et al., 2013). Na obrázku je zeleně zobrazena rigidní klička TRPV3 kánálu (Finger 3), která se nachází mezi třetí a čtvrtou ankyrinovou repeticí a je zřejmě důležitým regulačním místem aktivity TRPV3 receptoru. Mutace na pozici T264, která je schována za touto kličkou, přinesly zajímavé výsledky, které potvrzují účast tohoto místa v regulaci aktivity TRPV3 kanálu. Jedna z provedených mutací na této pozici, byla výměna treoninu za tryptofan, který je zobrazen na obrázku. Tato mutace se projevila zvýšenou aktivitou TRPV3 receptoru, která mohla být způsobená velkým postranním řetězcem tryptofanu, který mohl interagovat s jinými strukturami nebo způsobit konformační změnu Fingru 3.

T35D, T343D: Mutace na těchto pozicích významně snížily citlivost TRPV3 receptoru na 2-APB. Zaznamenali jsme pouze nepatrné proudové odpovědi, zejména u mutace T343D, která měla statisticky významně sníženou amplitudu při první i čtvrté stimulaci 2-APB. Proudové odpovědi těchto mutantních forem byly pozorovány až při synergickém působení agonistů, přičemž mutace T343D se podobala svojí odpovědí WT a mutace T35D svou odpovědí překvapivě převyšovala nejen WT, ale i všechny ostatní mutace. V obou případech tedy došlo spíše k porušení převodu vazby 2-APB na otevření kanálu, protože synergie 2-APB a karvakrolu byla zachována. Nečekané chování mutace T343D by mohlo být způsobeno pozicí tohoto rezidua v ARD a také ne příliš velkou vzdáleností od histidinu 426, který byl identifikován jako jedno z reziduí zodpovědných za aktivaci TRPV3 receptoru pomocí 2-APB.

8 ZÁVĚR

- Podařilo se nám funkčně exprimovat rekombinantní lidský TRPV3 receptor v HaCaT buňkách a ověřit jeho charakteristické vlastnosti popsané v literatuře: senzitivace, teplotní aktivace a synergický účinek dvou agonistů
- Určili jsme osm potenciálních míst pro fosforylaci TRPV3 receptoru ERK protein kinázou, zkonstruovali mutanty, u kterých byla postupně zaměněna určená rezidua za aminokyselinové zbytky, které mimikují fosforylaci a funkčně je ověřili metodou patch-clamp
- U mutace S60D a T96D jsme pozorovali stejné chování jako u WT
- U mutace S85D a S102D jsme zřejmě porušili převod synergického účinku 2-APB a karvakrolu. To je velmi zajímavý výsledek z hlediska hledání možných mechanismů aktivace TRPV3, protože v literatuře doposud nebylo popsáno, jakým mechanismem působí karvakrol na tento receptor
- Navrhli jsme další bodové záměny na pozici T264, které by mohly pomoci vysvětlit zvýšení odpovědi pozorované u konstruktu T264D. Chování pozorované u mutací T264D a T264E naznačují, že možným cílem ERK kinázy je právě treonin na pozici T264. Tento fakt je dále podpořen i mutací T264W a také polohou tohoto treoninu v ankyrinové doméně pod kritickou kličkou zodpovědnou za regulaci aktivity TRPV3 receptoru
- U mutací T35D a T343D došlo k porušení citlivosti TRPV3 receptoru k 2-APB, přičemž pozice T343 nacházející se v ankyrinové doméně by mohla nasvědčovat tomu, že jde o další důležité reziduum podílející se na regulaci TRPV3 receptoru, což by mohlo být námětem pro další studium

9 CITOVANÁ LITERATURA

- Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, Reichling D, Levine JD (A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *J Neurosci* 26:3864-3874.2006).
- Alessandri-Haber N, Joseph E, Dina OA, Liedtke W, Levine JD (TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain* 118:70-79.2005).
- Bang S, Kim KY, Yoo S, Lee SH, Hwang SW (Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci Lett* 425:120-125.2007).
- Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Hwang SW (Farnesyl pyrophosphate is a novel pain-producing molecule via specific activation of TRPV3. *J Biol Chem* 285:19362-19371.2010).
- Boukalová Štěpána, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Disertační práce, Mechanizmy aktivace a modulace vaniloidních TRP receptorů, Praha 2013
- Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D (TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504:113-118.2013).
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.2000).
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441.1999).
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.1997).
- Cheng X, Jin J, Hu L, Shen D, Dong XP, Samie MA, Knoff J, Eisinger B, Liu ML, Huang SM, Caterina MJ, Dempsey P, Michael LE, Dlugosz AA, Andrews NC, Clapham DE, Xu H (TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell* 141:331-343.2010).
- Chung MK, Lee H, Caterina MJ (Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem* 278:32037-32046.2003).

- Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ (2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* 24:5177-5182.2004).
- Cosens DJ, Manning A (Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285-287.1969).
- Davis KD, Pope GE (Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain* 98:179-185.2002).
- Delany NS, Hurle M, Facer P, Alnadaf T, Plumpton C, Kinghorn I, See CG, Costigan M, Anand P, Woolf CJ, Crowther D, Sanseau P, Tate SN (Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics* 4:165-174.2001).
- Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A (Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 29:135-161.2006).
- Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V (Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods* 151:178-185.2006).
- Dittert I, Vlachova V, Knotkova H, Vitaskova Z, Vyklicky L, Kress M, Reeh PW (A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J Neurosci Methods* 82:195-201.1998).
- Ferby I, Reschke M, Kudlacek O, Knyazev P, Pante G, Amann K, Sommergruber W, Kraut N, Ullrich A, Fassler R, Klein R (Mig6 is a negative regulator of EGF receptor-mediated skin morphogenesis and tumor formation. *Nat Med* 12:568-573.2006).
- Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M (Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22:6408-6414.2002).
- Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H (Molecular physiology of urate transport. *Physiology (Bethesda)* 20:125-133.2005).
- Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, Kersten FF, van der Kemp AW, Merillat AM, Waarsing JH, Rossier BC, Vallon V, Hummler E, Bindels RJ (Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest* 112:1906-1914.2003).
- Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, Zhu MX (2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 279:35741-35748.2004).

- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8400-8405.2002).
- Huang SM, Li X, Yu Y, Wang J, Caterina MJ (TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain* 7:37.2011).
- Kaneko Y, Szallasi A (Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol* 171:2474-2507.2014).
- Kort ME, Kym PR (TRPV1 antagonists: clinical setbacks and prospects for future development. *Prog Med Chem* 51:57-70.2012).
- Lee H, Iida T, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ (Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* 25:1304-1310.2005).
- Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y (Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504:107-112.2013).
- Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S (Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103:525-535.2000).
- Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R (The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54:905-918.2007).
- Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A (The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol* 15:929-934.2005).
- McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D (Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52-58.2002).
- Minke B (The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet* 24:216-233.2010).
- Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G (Rescue of the Drosophila phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* 230:1040-1043.1985).
- Montell C, Rubin GM (Molecular characterization of the Drosophila *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313-1323.1989).

- Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A (Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307:1468-1472.2005).
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M (Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* 1:3.2005).
- Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N (Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence. *J Biol Chem* 282:15894-15902.2007).
- Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ (TRPV5 and TRPV6 in Ca^{2+} (re)absorption: regulating Ca^{2+} entry at the gate. *Pflugers Arch* 451:181-192.2005).
- Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, Caterina MJ (TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci* 31:11425-11436.2011).
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296:2046-2049.2002).
- Phelps CB, Wang RR, Choo SS, Gaudet R (Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *J Biol Chem* 285:731-740.2010).
- Schneider MR, Werner S, Paus R, Wolf E (Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *Am J Pathol* 173:14-24.2008).
- Schrader LA, Birnbaum SG, Nadin BM, Ren Y, Bui D, Anderson AE, Sweatt JD (ERK/MAPK regulates the Kv4.2 potassium channel by direct phosphorylation of the pore-forming subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C852-861.2006).
- Shen B, Kwan HY, Ma X, Wong CO, Du J, Huang Y, Yao X (cAMP activates TRPC6 channels via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (PKB)-mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)-ERK1/2 signaling pathway. *J Biol Chem* 286:19439-19445.2011).
- Shi DJ, Ye S, Cao X, Zhang R, Wang K (Crystal structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of TRPV3 reveals unique conformation of finger 3 loop critical for channel function. *Protein Cell* 4:942-950.2013).

- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418:186-190.2002).
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819-829.2003).
- Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD (OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2:695-702.2000).
- Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K (Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* 88:544-548.2002).
- Todaka H, Taniguchi J, Satoh J, Mizuno A, Suzuki M (Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem* 279:35133-35138.2004).
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531-543.1998).
- Touska F, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V (A "cute" desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol* 12:122-129.2011).
- Vennekens R, Hoenderop JG, Prenen J, Stuiver M, Willems PH, Droogmans G, Nilius B, Bindels RJ (Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. *J Biol Chem* 275:3963-3969.2000).
- Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B (Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277:47044-47051.2002).
- Wissenbach U, Bodding M, Freichel M, Flockerzi V (Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett* 485:127-134.2000).
- Xiao R, Tang J, Wang C, Colton CK, Tian J, Zhu MX (Calcium plays a central role in the sensitization of TRPV3 channel to repetitive stimulations. *J Biol Chem* 283:6162-6174.2008).

- Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE (Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* 9:628-635.2006).
- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE (TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418:181-186.2002).
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-457.1999).